

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 284**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2006 E 13155091 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2620450**

54 Título: **Composiciones de anticuerpo anti-CTLA-4**

30 Prioridad:

**08.03.2005 US 659766 P**

**19.10.2005 US 728165 P**

**20.12.2005 US 752712 P**

**26.01.2006 US 762456 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**03.04.2019**

73 Titular/es:

**PFIZER PRODUCTS INC. (100.0%)**

**Eastern Point Road**

**Groton, CT 06340, US**

72 Inventor/es:

**ABATE, JUSTIN DONALD;**

**DAS, TAPAN KANTI;**

**ELLIOTT, CARRIE MARIE;**

**MUTHURANIA, KEVIN WAMITI;**

**NEMA, SANDEEP y**

**SINGH, SATISH KUMAR**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 707 284 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Composiciones de anticuerpo anti-CTLA-4

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

5 El antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 ("CTLA-4") es un miembro de la superfamilia de proteínas inmunoglobulinas ("Ig"). El CTLA-4 actúa regulando negativamente la activación de linfocitos T y manteniendo la homeostasis inmunológica. Se ha mostrado que el bloqueo de CTLA-4 (p.ej., mediante el uso de anticuerpos de CTLA-4) en modelos animales mejora la eficacia de la inmunoterapia del cáncer.

10 Se han reseñado en la bibliografía anticuerpos que se unen a e inhiben la actividad de CTLA-4. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.682.736, asignada a Pfizer, Inc. y Abgenix, Inc., reseña varios anticuerpos monoclonales humanos de CTLA-4, incluyendo un anticuerpo de CTLA-4 que tiene las secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera del anticuerpo 11.2.1, conocido ahora como ticilimumab™. Se depositó una línea celular de hibridoma productora del anticuerpo 11.2.1 con el nº de acceso a ATCC PTA-5169. La patente de EE.UU. nº 5.977.318, asignada a Bristol-Myers Squibb Company, reseña otro anticuerpo monoclonal que reconoce y se une al dominio extracelular de CTLA-4, evitando así la unión de CTLA-4 al antígeno B7. La solicitud publicada de EE.UU. nº 20050201994, asignada a Medarex, Inc., reseña varios anticuerpos de secuencia humana de CTLA-4, incluyendo uno al que se hace referencia ahora como ipilimumab™.

20 La administración parenteral es un posible modo de administración de dichos anticuerpos de CTLA-4. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.682.736 reseña una formulación intravenosa de anticuerpo anti-CTLA-4 que es una solución líquida estéril que contiene anticuerpos anti-CTLA-4, acetato de sodio 20 mM, polisorbato 80 0,2 mg/ml y cloruro de sodio 140 mM a pH 5,5. Además, el documento US2003/138417 describe una formulación farmacéutica líquida estable que comprende una alta concentración, p.ej. 50 mg/ml o más, de anticuerpo en tampón de succinato aproximadamente 20-60 mM o tampón de histidina 30-70 mM que tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, aproximadamente 0,001-0,1 % de polisorbato y un modificador de la tonicidad que contribuye a la isotonicidad de la formulación.

25 Como otras formulaciones de proteína, las formulaciones de anticuerpo de CTLA-4 están sujetas a los mismos problemas respecto a la degradación química y física del anticuerpo en la formulación con el tiempo. En general, las formulaciones de anticuerpo de CTLA-4 deberían exhibir unas estabilidades química y física aceptables en el intervalo esperado de condiciones de almacenamiento y uso, concretamente la formulación de anticuerpo de CTLA-4 debería tener una vida útil suficiente aun permaneciendo biológicamente activa. Dado el tiempo y los recursos necesarios para producir un producto de anticuerpo de CTLA-4, son deseables formulaciones que reduzcan la pérdida de producto. Por consiguiente, la presente solicitud da a conocer formulaciones de anticuerpo de CTLA-4 novedosas que exhiben una estabilidad química y/o física mejorada respecto a formulaciones de anticuerpo de CTLA-4 dadas a conocer anteriormente en la bibliografía.

**SUMARIO**

35 La presente invención se define por las reivindicaciones. Con más detalle, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida que comprende: un agente quelante, en la que el agente quelante es EDTA, una sal de EDTA, DTPA, o una sal de DTPA a una concentración de 0,01 a 5,0 mM; histidina a una concentración de 1 a 100 mM y un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano que se une a CTLA-4 humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, anticuerpo o porción de unión a antígeno que está a una concentración de 1 a 200 mg/ml y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 7, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 8, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 9 y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 10, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 11, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 12.

45 Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano y un agente quelante.

50 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que el anticuerpo es un anticuerpo IgG2.

55 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos



aminoacídica de región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 5 y una secuencia aminoacídica de región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 6.

5 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que el anticuerpo comprende una secuencia aminoacídica de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2 y una secuencia aminoacídica de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 4.

10 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo no está presente.

15 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que el anticuerpo comprende un anticuerpo monoclonal de IgG2 anti-CTLA-4 que tiene las secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera del anticuerpo 11.2.1.

20 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que el anticuerpo tiene las mismas secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera que el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 11.2.1.4 depositada con el nº de acceso a ATCC PTA-5169.

25 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que el anticuerpo es ticilimumab.

30 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que el agente quelante se selecciona del grupo consistente en ácidos aminopolicarboxílicos, ácidos hidroxiaminocarboxílicos, sales y derivados de EDTA, glicinas N-sustituidas, derivados de deferoxamina y mezclas de los mismos.

35 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que el agente quelante se selecciona del grupo consistente en ácido etilendiaminotetraacético, ácido dietilentriaminopentaacético, ácido nitrilotriacético, ácido N-2-acetamido-2-iminodiacético, bis(aminoetil)glicoléter, ácido N,N,N',N'-tetraacético, ácido trans-diaminociclohexanotetraacético, ácido glutámico, ácido aspártico, ácido N-hidroxi-etiliminodiacético, N,N-bis-hidroxi-etilglicina, N-(trishidroximetilmetil)glicina, glicilglicina, ácido 2-(2-amino-2-oxoetil)aminoetanosulfónico, deferoxamina, mesilato de deferoxamina, edetato dipotásico, edetato de sodio, calcioedetato de sodio, edetato de sodio, edetato de trisodio, edetato de potasio, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido cítrico anhidro, citrato de trisodio dihidratado, niacinamida, desoxicolato de sodio y mezclas de los mismos.

40 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que el agente quelante es EDTA.

5 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, que comprende adicionalmente un tampón.

10 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, que comprende adicionalmente un tampón, en la que el tampón se selecciona del grupo consistente en acetato, succinato, gluconato, citrato, histidina, ácido acético, fosfato, ácido fosfórico, ascorbato, ácido tartárico, ácido maleico, glicina, lactato, ácido láctico, ácido ascórbico, imidazol, bicarbonato y ácido carbónico, ácido succínico, benzoato de sodio, ácido benzoico, gluconato, edetato, acetato, malato, imidazol, tris, fosfato y mezclas de los mismos.

15 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, que comprende adicionalmente un tampón, en la que el tampón comprende histidina.

20 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, que comprende adicionalmente histidina, en la que la histidina comprende L-histidina o D-histidina.

25 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, que comprende adicionalmente histidina, en la que la histidina comprende L-histidina.

30 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, que comprende adicionalmente histidina, en la que la histidina comprende L-histidina.

35 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano, y un agente quelante; en la que la composición contiene una concentración de anticuerpos en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 mg/ml.

40 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición contiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 20 mg/ml.

45 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un excipiente seleccionado del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones.

50 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos dos excipientes seleccionados del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones.

55 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos dos excipientes seleccionados del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones.

pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un agente de tonicidad, un tensioactivo y un tampón.

5 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente un agente de tonicidad, un antioxidante, un tensioactivo y un tampón.

10 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un excipiente seleccionado del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones, en la que el agente de tonicidad comprende un sacárido.

15 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un excipiente seleccionado del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones, en la que el agente de tonicidad comprende al menos un excipiente que se selecciona del grupo consistente en fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, lactosa, maltosa, sacarosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrinas, almidón soluble, hidroxietilalmidón, glucanos hidrosolubles y mezclas de los mismos.

20 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un excipiente seleccionado del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones, en la que el agente de tonicidad comprende un poliol.

25 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un excipiente seleccionado del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones, en la que el poliol se selecciona del grupo consistente en manitol, trehalosa, sorbitol, eritritol, isomaltitol, lactitol, maltitol, xilitol, glicerol, lactitol, propilenglicol, polietilenglicol, inositol y mezclas de los mismos.

30 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un excipiente seleccionado del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones, en la que el agente de tonicidad comprende un azúcar no reductor.

35 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un excipiente seleccionado del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones, en la que el agente de tonicidad comprende un azúcar no reductor, en la que el azúcar no reductor comprende al menos un excipiente que se selecciona del grupo consistente en sacarosa, trehalosa y mezclas de los mismos.

40 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un excipiente seleccionado del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones, en la que el agente de tonicidad comprende un azúcar no reductor, en la que el azúcar no reductor comprende al menos un excipiente que se selecciona del grupo consistente en sacarosa, trehalosa y mezclas de los mismos.

un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un excipiente seleccionado del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones, en la que el agente de tonicidad comprende un azúcar no reductor, en la que el azúcar no reductor es trehalosa.

5 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al  
10 menos un excipiente seleccionado del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones, en la que el tensioactivo se selecciona del grupo consistente en polisorbatos, poloxámeros, Tritones, dodecilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio, octilglicósido de sodio, laurilsulfobetaina, miristilsulfobetaina, linoleilsulfobetaina, estearilsulfobetaina, laurilsarcosina, miristilsarcosina, linoleilsarcosina, estearilsarcosina, linoleilbetaína, miristilbetaína, cetilbetaína, lauramidopropilbetaína, cocamidopropilbetaína, linoleamidopropilbetaína, miristamidopropilbetaína, palmidopropilbetaína, isoestearamidopropilbetaína, miristamidopropildimetilamina, palmidopropildimetilamina, isoestearamidopropildimetilamina, metilcooiltaurato de sodio, metiloleiltaurato de disodio, cloruro de dihidroxipropil-PEG 5-linoleamonio, polietilenglicol, polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un excipiente seleccionado del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones, en la que el tensioactivo se selecciona del grupo consistente en polisorbato 20, polisorbato 21, polisorbato 40, polisorbato  
20 60, polisorbato 61, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 81, polisorbato 85 y mezclas de los mismos.

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un excipiente seleccionado del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones, en la que el tensioactivo es polisorbato 80.  
30

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un excipiente seleccionado del grupo consistente en agentes de tonicidad, tensioactivos y tampones, en la que el tampón comprende histidina.  
35

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente polisorbato 80.  
40 45

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que la composición comprende adicionalmente trehalosa.  
50

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano y un agente quelante, en la que la composición comprende histidina, trehalosa, polisorbato 80 y EDTA.  
55

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena



- 5 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; en la que la composición comprende de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml de anticuerpo, de aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml de EDTA, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM de histidina, de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de polisorbato 80 y de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml de trehalosa.
- 10 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; en la que la composición comprende histidina, trehalosa, polisorbato 80 y
- 15 EDTA; en la que la composición comprende: aproximadamente 20 mg/ml de anticuerpo, aproximadamente 0,1 mg/ml de EDTA, aproximadamente 20 mM de histidina, aproximadamente 0,2 mg/ml de polisorbato 80 y aproximadamente 84 mg/ml de trehalosa.
- 20 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo, en la que el anticuerpo comprende una secuencia aminoacídica de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2 y una secuencia aminoacídica de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, y el anticuerpo es estable a una temperatura de aproximadamente 5 °C durante al menos aproximadamente 26 semanas.
- 25 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo, en la que el anticuerpo comprende una secuencia aminoacídica de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2 y una secuencia aminoacídica de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, y el anticuerpo es estable a una temperatura de aproximadamente 25 °C durante al menos aproximadamente 26 semanas.
- 30 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo, en la que el anticuerpo comprende una secuencia aminoacídica de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2 y una secuencia aminoacídica de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, y el anticuerpo es estable a una temperatura de aproximadamente 40 °C durante al menos aproximadamente 26 semanas.
- 35 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que el anticuerpo es estable durante al menos un ciclo de congelación y descongelación de la composición.
- 40 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que el anticuerpo es estable durante al menos seis ciclos de congelación y descongelación de la composición.
- 45 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que cuando la composición se almacena durante
- 50 un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, la disminución entre el área de pico de cromatograma agregado para la composición y el área de pico de cromatograma agregado de una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante, que se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, es de al menos aproximadamente un 2 %.
- 55 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que cuando la composición se almacena durante

5 un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, la disminución entre el área de pico de cromatograma agregado para la composición y el área de pico de cromatograma agregado de una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante, que se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, es de al menos aproximadamente un 2 %, en la que la separación cromatográfica comprende SE-HPLC.

10 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que cuando la composición se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, la disminución entre el área de pico de cromatograma agregado para la composición y el área de pico de cromatograma agregado de una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante, que se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, es de al menos aproximadamente un 2 %, en la que se usa detección ultravioleta para medir la cantidad de anticuerpos que han agregado.

20 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que cuando la composición se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, la disminución entre el área de pico de cromatograma agregado para la composición y el área de pico de cromatograma agregado de una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante, que se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, es de al menos aproximadamente un 2 %, en la que se efectúa la detección ultravioleta a 214 nanómetros.

30 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que cuando la composición se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, la disminución entre el área de pico de cromatograma agregado para la composición y el área de pico de cromatograma agregado de una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante, que se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, es de al menos aproximadamente un 2 %, en la que después de almacenar la composición durante un periodo de aproximadamente 24 semana a una temperatura de aproximadamente 40 °C, la composición continúa sustancialmente transparente e incolora.

40 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que cuando la composición se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, la disminución entre el área de pico de cromatograma agregado para la composición y el área de pico de cromatograma agregado de una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante, que se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, es de al menos aproximadamente un 2 %, en la que cuando la composición se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, se reduce el porcentaje total de oxidación de residuos de metionina en la posición 432 en una cantidad que es mayor o igual al 2,2 %, determinada después de digestión enzimática con lisil endopeptidasa seguida de separación con HPLC en fase inversa, en comparación con los anticuerpos de una composición que está exenta de agente quelante.

50 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante, en la que cuando la composición se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, la disminución entre el área de pico de cromatograma agregado para la composición y el área de pico de cromatograma agregado de una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante, que se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, es de al menos aproximadamente un 2 %, en la que cuando la composición se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, se reduce el porcentaje total de oxidación de residuos de metionina en la posición aminoacídica 256 en una cantidad que es mayor o igual al 4,2 %, determinada después de digestión

enzimática con lisil endopeptidasa seguida de separación con HPLC en fase inversa, en comparación con los anticuerpos de una composición que está exenta de agente quelante.

5 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo consistente esencialmente en una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y consistente esencialmente además en una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante.

10 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo consistente en una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y consistente además en una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante.

15 Se describe también en la presente memoria un procedimiento para preparar una composición farmacéutica líquida estable que comprende mezclar anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 con un agente quelante farmacéuticamente aceptable en una cantidad que reduzca la inestabilidad del anticuerpo, en el que cuando la composición se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, la disminución entre el área de pico de cromatograma agregado para la composición farmacéutica líquida estable que comprende anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 y agente quelante y el área de pico de cromatograma agregado para una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante, que se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, es de al menos aproximadamente un 2 %.

25 Se describe también en la presente memoria un procedimiento para estabilizar anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 en una composición farmacéutica líquida que comprende formar una composición líquida que comprende los anticuerpos y un agente quelante farmacéuticamente aceptable, en el que cuando la composición se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, la disminución entre el área de pico de cromatograma agregado para la composición farmacéutica líquida estable que comprende anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 y agente quelante y el área de pico de cromatograma agregado para una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante, que se almacena durante un periodo de aproximadamente 24 semanas a una temperatura de aproximadamente 40 °C, es de al menos aproximadamente un 2 %.

30 Se describe también en la presente memoria un procedimiento para el tratamiento de una afección neoplásica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica líquida que comprende: una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab y un agente quelante farmacéuticamente aceptable.

35 Se describe también en la presente memoria un procedimiento para el tratamiento de una afección neoplásica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica líquida que comprende: una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab y un agente quelante farmacéuticamente aceptable, en el que la composición se administra al sujeto por vía intravenosa.

40 Se describe también en la presente memoria un procedimiento para el tratamiento de una afección neoplásica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica líquida que comprende: una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab y un agente quelante farmacéuticamente aceptable, en el que el sujeto está necesitado de tratamiento de una afección neoplásica.

45 Se describe también en la presente memoria un procedimiento para el tratamiento de una afección neoplásica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica líquida que comprende: una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab y un agente quelante farmacéuticamente aceptable, en el que la afección neoplásica es un cáncer que se selecciona del grupo consistente en cáncer de cerebro, carcinoma escamoso, de vejiga, gástrico, pancreático, de mama, cabeza, cuello, esofágico, de próstata, colorrectal, de pulmón, renal, de riñón, ovario, ginecológico y tiroideo.

50 Se describe también en la presente memoria un kit para preparar una composición líquida de un anticuerpo estabilizado que comprende: un primer envase que comprende el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab en solución, y un segundo envase que comprende un agente quelante farmacéuticamente aceptable.

Se describe también en la presente memoria un artículo de fabricación que comprende un envase que contiene una mezcla de del menos un anticuerpo anti-CTLA-4 que tiene las secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera del ticilimumab y un agente quelante.

55 Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 y un agente quelante farmacéuticamente aceptable, en la que la concentración molar de los anticuerpos oscila de aproximadamente 0,0006 mM a aproximadamente 1,35 mM y la concentración molar de

agente quelante oscila de aproximadamente 0,003 mM a aproximadamente 50 mM, y en la que la relación molar de anticuerpos a agente quelante oscila de aproximadamente 0,00001 a aproximadamente 450.

- 5 Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 y un agente quelante farmacéuticamente aceptable, en la que la concentración molar de los anticuerpos oscila de aproximadamente 0,0006 mM a aproximadamente 1,35 mM y la concentración molar de agente quelante oscila de aproximadamente 0,003 mM a aproximadamente 50 mM, y en la que la relación molar de anticuerpos a agente quelante oscila de aproximadamente 0,00001 a aproximadamente 450, en la que los anticuerpos comprenden anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 que tienen las secuencias aminoacídicas de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo ticilimumab.
- 10 Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 y un agente quelante farmacéuticamente aceptable, en la que la concentración molar de los anticuerpos oscila de aproximadamente 0,0006 mM a aproximadamente 1,35 mM y la concentración molar de agente quelante oscila de aproximadamente 0,003 mM a aproximadamente 50 mM, y en la que la relación molar de anticuerpos a agente quelante oscila de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100.
- 15 Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 y un agente quelante farmacéuticamente aceptable, en la que la concentración molar de los anticuerpos oscila de aproximadamente 0,0006 mM a aproximadamente 1,35 mM y la concentración molar de agente quelante oscila de aproximadamente 0,003 mM a aproximadamente 50 mM, y en la que la relación molar de anticuerpos a agente quelante oscila de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10.
- 20 Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 y un agente quelante farmacéuticamente aceptable, en la que la concentración molar de los anticuerpos oscila de aproximadamente 0,0006 mM a aproximadamente 1,35 mM y la concentración molar de agente quelante oscila de aproximadamente 0,003 mM a aproximadamente 50 mM, y en la que la relación molar de anticuerpos a agente quelante oscila de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1.
- 25 Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 y un agente quelante farmacéuticamente aceptable, en la que la concentración molar de los anticuerpos oscila de aproximadamente 0,0006 mM a aproximadamente 1,35 mM y la concentración molar de agente quelante oscila de aproximadamente 0,003 mM a aproximadamente 50 mM, y en la que la relación molar de anticuerpos a agente quelante oscila de aproximadamente 0,00001 a aproximadamente 450, en la que la relación molar de anticuerpos a agente quelante es de aproximadamente 0,5.
- 30 Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende al menos un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 humano, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un agente quelante.
- 35 Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición contiene una concentración de anticuerpo que es de al menos aproximadamente 10 mg/ml.
- 40 Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición
- 45 contiene una concentración de anticuerpo que oscila de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml.
- 50 Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición contiene una concentración de anticuerpo que oscila de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml.
- 55 Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición contiene una concentración de anticuerpo que es de aproximadamente 20 mg/ml.

- 5 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende: un agente quelante y al menos un anticuerpo que comprende: una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2 y una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano.
- 10 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende: un agente quelante y al menos un anticuerpo que comprende: una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2 y una secuencia aminoacídica que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano, en la que el anticuerpo comprende un anticuerpo monoclonal de IgG2 anti-CTLA-4 que tiene las secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera de ticilimumab.
- 15 Se describe también en la presente memoria un procedimiento para preparar una composición farmacéutica líquida que comprende mezclar al menos un anticuerpo anti-CTLA-4, que tiene las secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera de ticilimumab en solución, con al menos un agente quelante.
- 20 Se describe también en la presente memoria un procedimiento para el tratamiento de una afección neoplásica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica líquida que comprende: una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-CTLA-4 que tiene las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de ticilimumab; y un agente quelante farmacéuticamente aceptable.
- 25 Se describe también en la presente memoria un kit para preparar una composición líquida de un anticuerpo estabilizado que comprende: un primer envase que comprende al menos un anticuerpo anti-CTLA-4 que tiene las secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera de ticilimumab en solución, y un segundo envase que comprende un agente quelante farmacéuticamente aceptable.
- Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende: al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición contiene una concentración de anticuerpo que es de al menos aproximadamente 10 mg/ml.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 30 La Figura 1 es una gráfica de barras que muestra el porcentaje de agregación en diversas formulaciones de prueba después de almacenamiento a 40 °C durante hasta 7 semanas por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).
- La Figura 2 es una gráfica de barras que muestra el porcentaje de formación de impurezas totales (hidrolíticas) en diversas formulaciones de prueba después de almacenamiento a 40 °C durante hasta 7 semanas mediante PAGE-SDS reducida (PAGE-SDSr).
- 35 La Figura 3 es una gráfica lineal que muestra el porcentaje de agregación en diversas formulaciones de prueba con almacenamiento en condiciones aceleradas a 40 °C durante hasta 24 semanas por SEC.
- La Figura 4 es una gráfica lineal que muestra el porcentaje total de formación de impurezas (hidrolíticas) en diversas formulaciones de prueba con almacenamiento en condiciones aceleradas a 40 °C durante hasta 24 semanas por PAGE-SDSr.
- 40 La Figura 5 es una gráfica lineal que muestra el porcentaje de agregación en diversas formulaciones de prueba con almacenamiento en condiciones aceleradas a 40 °C durante hasta 24 semanas mediante SEC.
- La Figura 6 es una gráfica lineal que muestra el porcentaje de formación de impurezas totales (hidrolíticas) en diversas formulaciones de prueba con almacenamiento en condiciones aceleradas a 40 °C durante hasta 24 semanas mediante PAGE-SDSr.
- 45 La Figura 7 es una gráfica de barras que muestra el porcentaje de agregación en diversas formulaciones de prueba en función del nivel de EDTA con almacenamiento en condiciones aceleradas a 40 °C durante hasta 24 semanas mediante SEC.
- La Figura 8 es una gráfica de barras que muestra el porcentaje de formación de impurezas totales (hidrolíticas) en diversas formulaciones de prueba en función del nivel de EDTA con almacenamiento en condiciones aceleradas a 50 40 °C durante hasta 24 semanas mediante PAGE-SDSr.
- La Figura 9 es una gráfica lineal que muestra el porcentaje de agregación en diversas formulaciones de prueba con almacenamiento en condiciones aceleradas a 40 °C durante hasta 13 semanas mediante SEC.

La Figura 10 es una gráfica lineal que muestra el porcentaje de formación de impurezas totales (hidrolíticas) en diversas formulaciones de prueba con almacenamiento en condiciones aceleradas a 40 °C durante hasta 13 semanas mediante PAGE-SDS.

Y la Figura 11, que comprende las Figuras 11A-11D, muestra las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1, al que se hace referencia ahora como ticilimumab. La Figura 11A muestra la secuencia nucleotídica completa de la cadena pesada de 11.2.1 (SEQ ID NO: 1). La Figura 11B muestra la secuencia nucleotídica completa de la cadena pesada de 11.2.1 (SEQ ID NO: 2) y la secuencia aminoacídica de la región variable de cadena pesada de 11.2.1 indicada entre corchetes “[ ]” (SEQ ID NO: 5). Se subraya la secuencia aminoacídica de cada CDR de cadena pesada de 11.2.1. Las secuencias de CDR son como sigue: CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 7); CDR2: VIWYDGSNKYVADSV (SEQ ID NO: 8) y CDR3: DPRGATLYYYYYGMDV (SEQ ID NO: 9). La Figura 11C muestra la secuencia nucleotídica de la cadena ligera completa de 11.2.1 (SEQ ID NO: 3). La Figura 11D muestra la secuencia aminoacídica de la cadena ligera completa de 11.2.1 (SEQ ID NO: 4) y la región variable de cadena ligera indicada entre corchetes “[ ]” (SEQ ID NO: 6). Se indica la secuencia aminoacídica de cada CDR como sigue: CDR1: RASQSINSYLD (SEQ ID NO: 10); CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO: 11) y CDR3: QQYVSTPFT (SEQ ID NO: 12).

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los procedimientos y técnicas descritos en la presente memoria se efectúan generalmente según procedimientos convencionales bien conocidos en la materia y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique otra cosa. Véanse, p.ej., Sambrook *et al.*, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel *et al.*, “Current Protocols in Molecular Biology”, Greene Publishing Associates (1992) y Harlow and Lane “Antibodies: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Se efectúan las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante, como se logra comúnmente en la materia o como se describe en la presente memoria. Las nomenclaturas usadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en la materia. Se usan técnicas estándares para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y suministro farmacéutico y tratamiento de sujetos.

#### Definiciones:

Para ayudar al lector a comprender la siguiente descripción detallada, se proporcionan las siguientes definiciones:

Como se usan en la presente memoria, los términos “formulación” o “composición”, en relación con un anticuerpo anti-CTLA-4, pretenden describir el anticuerpo en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable que comprende un agente quelante. Por ejemplo, las formulaciones de la invención tienen una vida útil y/o estabilidad mejorada en comparación con formulaciones reconocidas en la materia.

Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo” hace referencia a un anticuerpo intacto o a una porción de unión a antígeno que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica. Véase en general “Fundamental Immunology”, Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las porciones de unión a antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las porciones de unión a antígeno pueden incluir Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb y fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de anticuerpo que es suficiente para conferir unión a antígeno específica al polipéptido. Del extremo N al extremo C, tanto los dominios variables de cadena ligera como pesada madura comprenden las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de los aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987) o Chothia *et al.*, *Nature* 342: 878-883 (1989).

Como se usa en la presente memoria, el término “polipéptido” engloba proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteína y análogos polipeptídicos de una secuencia proteica. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

Como se usa en la presente memoria, un fragmento Fd significa un fragmento de anticuerpo que consiste en los dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H</sub>1; un fragmento Fv consiste en los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un solo brazo de un anticuerpo y un fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341: 544-546 (1989)) consiste en un dominio V<sub>H</sub>.

El término “o una porción de unión a antígeno del mismo”, cuando se usa con el término “anticuerpo”, hace referencia a un polipéptido que tiene una delección aminoterminal y/o carboxiterminal, pero en que la secuencia aminoacídica restante es idéntica a las correspondientes posiciones en la secuencia de origen natural. Los fragmentos pueden ser de al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud. Los fragmentos pueden ser de al menos 14, al menos 20, al menos 50, o al menos 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos de longitud.

Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo monoclonal” hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, concretamente los anticuerpos individuales comprendidos en la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores o por carecer de lisina C-terminal. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, al estar dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además, en contraposición con las preparaciones de anticuerpo (policlonal) convencionales, que incluyen típicamente anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante en el antígeno. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo, que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no ha de considerarse que requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden elaborarse mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler, *et al.*, Nature 256: 495 (1975), o pueden elaborarse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, p.ej., la patente de EE.UU. nº 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” pueden aislarse también de colecciones de anticuerpos en fago usando las técnicas descritas en Clackson, *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991) y Marks, *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), por ejemplo,

Como se usan en la presente memoria, los términos “anticuerpo aislado” o “anticuerpo purificado” hacen referencia a un anticuerpo que, en virtud de su origen o fuente de derivación, tiene de 1 a 4 de los rasgos siguientes: (1) no está asociado a componentes naturalmente asociados que lo acompañan en su estado nativo, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente o (4) no aparece en la naturaleza. Por tanto, un anticuerpo que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente está aislado y purificado de sus componentes naturalmente asociados. Un anticuerpo puede volverse también sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados mediante aislamiento y purificación, usando técnicas de purificación de proteína bien conocidas en la materia. Los ejemplos de anticuerpos aislados/purificados incluyen un anticuerpo anti-CTLA-4 que se ha purificado por afinidad usando CTLA-4, un anticuerpo anti-CTLA-4 que se ha sintetizado mediante hibridoma u otra línea celular *in vitro* y un anticuerpo anti-CTLA-4 humano derivado de un ratón transgénico.

Los ejemplos de anticuerpos aislados/purificados pueden incluir un anticuerpo anti-CTLA-4 que se haya purificado por afinidad usando CTLA-4, un anticuerpo anti-CTLA-4 que se haya sintetizado por un hibridoma u otra línea celular *in vitro* y un anticuerpo anti-CTLA-4 derivado de un ratón transgénico. Por tanto, los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden tener una pureza de al menos aproximadamente un 95 % (p/p –peso de anticuerpos anti-CTLA-4/peso de componentes distintos de excipientes farmacéuticamente aceptables), y los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden tener una pureza de aproximadamente un 95 % p/p a aproximadamente un 99,5 % p/p.

Un anticuerpo es “sustancialmente puro”, “sustancialmente homogéneo” o “sustancialmente purificado” cuando al menos aproximadamente un 60 a 75 % de la muestra exhibe una sola especie de anticuerpo. El anticuerpo puede ser monomérico o multimérico. Un anticuerpo sustancialmente puro puede comprender típicamente aproximadamente un 50, 60, 70, 80 o 90 % p/p de una muestra de anticuerpo, más habitualmente aproximadamente un 95 % y preferiblemente será más de un 99 % puro. La pureza u homogeneidad del anticuerpo puede indicarse mediante una serie de medios bien conocidos en la materia, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de anticuerpo, seguido de visualización de una sola banda polipeptídica con tinción del gel con un tinte bien conocido en la materia. Con ciertos fines, puede conseguirse una mayor resolución usando HPLC u otros medios bien conocidos en la materia para purificación

Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo humano” pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos aminoacídicos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p.ej., mutaciones introducidas por mutagénesis *in vitro* aleatoria o específica de sitio o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, como se usa en la presente memoria, no pretende incluir anticuerpos en que las secuencias de CDR deriven de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, que se haya injertado en secuencias estructurales humanas.

Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo humano recombinante” pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora, anticuerpos aislados de una colección combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes, anticuerpos aislados de un animal (p.ej., un ratón) que es transgénico de los genes de inmunoglobulina humana (véase, p.ej., Taylor, L. D., *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico de secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*), y por tanto las secuencias aminoacídicas de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de línea germinal humana, pueden no existir naturalmente en el repertorio de línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*.

Como se usa en la presente memoria, el término “polinucleótido” o “ácido nucleico”, usados intercambiamente en la presente memoria, significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias. Una secuencia de “polinucleótido” o “ácido nucleico” engloba su complemento a menos que se especifique otra cosa. Por tanto, la referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debería entenderse que engloba su hebra complementaria, con su secuencia complementaria.

Como se usa en la presente memoria, el término “polinucleótido aislado” o “ácido nucleico aislado” significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos en que, en virtud de su origen o fuente de derivación, el polinucleótido aislado tiene de uno a tres de los siguientes rasgos: (1) no está asociado a todo o una porción de un polinucleótido con el que el “polinucleótido aislado” se encuentra en la naturaleza, (2) está enlazado operativamente con un polinucleótido con el que no está enlazado en la naturaleza o (3) no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

Como se usa en la presente memoria, el término “nucleótidos de origen natural” incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término “nucleótidos modificados”, como se usa en la presente memoria, incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. El término “ligamientos oligonucleotídicos” al que se hace referencia en la presente memoria incluye ligamientos oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoseleniato, fosforodiseleniato, fosforanilotoato, fosforaniladato, fosforamidato y similares. Véanse, p.ej., LaPlanche *et al.*, Nucl. Acids Res. 14: 9081 (1986); Stec *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 106: 6077 (1984); Stein *et al.*, Nucl. Acids Res. 16: 3209 (1988); Zon *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon *et al.*, “Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach”, pág. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (1991)); patente de EE.UU. nº 5.151.510; Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90: 543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir un marcaje para detección, si se desea.

Las secuencias “enlazadas operativamente” incluyen tanto secuencias de control de la expresión que son contiguas del gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a distancia para controlar el gen de interés. El término “secuencia de control de la expresión”, como se usa en la presente memoria, significa secuencias polinucleotídicas que son necesarias para afectar a la expresión y procesamiento de secuencias de codificación con las que están enlazadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de inicio y terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción apropiadas; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficacia de traducción (concretamente secuencia de consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de proteína y, cuando se desea, secuencias que potencian la secreción de proteína. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador, en procariontes, dichas secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de unión ribosómica y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariontes, generalmente dichas secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término “secuencias de control” pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia sea esencial para expresión y procesamiento, y puede incluir también componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa, por ejemplo secuencias líder y secuencias copartícipes de fusión.

Como se usa en la presente memoria, el término “vector” significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el que se ha enlazado. El vector puede ser un plásmido, concretamente un bucle de ADN bicatenario circular en que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. El vector puede ser un vector vírico en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma vírico. Los vectores pueden ser capaces de replicación autónoma en la célula hospedadora en la que se introducen (p.ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Los vectores (p.ej., vectores no episómicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras introducción en la célula hospedadora, y replicarse así junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes con que están enlazados operativamente. Se hace referencia a dichos vectores en la presente memoria como “vectores de expresión recombinante” (o simplemente “vectores de expresión”).

Como se usa en la presente memoria, el término “célula hospedadora recombinante” (o simplemente “célula hospedadora”) significa una célula en que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debería entenderse que “célula hospedadora recombinante” y “célula hospedadora” significan no solo la célula del sujeto particular, sino también la progenie de dicha célula. Debido a que pueden aparecer ciertas modificaciones en generaciones posteriores debido a mutación o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula original, pero se sigue incluyendo dentro del alcance “célula hospedadora” como se usa en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, el término “es capaz de unirse específicamente a” hace referencia a cuando un anticuerpo se une a un antígeno con una constante de disociación que es  $\leq 1 \mu\text{M}$ , preferiblemente  $\leq 1 \text{nM}$  y lo más preferiblemente  $\leq 10 \text{pM}$ .

Como se usa en la presente memoria, el término “hibrida selectivamente” significa se une detectable y específicamente. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención hibridan selectivamente con hebras de ácido nucleico en condiciones de hibridación y lavado que minimizan las

cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Puede usarse un “alto rigor” o condiciones “altamente rigurosas” para conseguir condiciones de hibridación selectivas como es conocido en la materia y se discute en la presente memoria. Es un ejemplo de “alto rigor” o condiciones “altamente rigurosas” la incubación de un polinucleótido con otro polinucleótido en la que un polinucleótido puede fijarse a una superficie sólida tal como una membrana en un tampón de hibridación de 6X SSPE o SSC, 50 % de formamida, 5X reactivo de Denhardt, 0,5 % de SDS, ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 100 µg/ml, a una temperatura de hibridación de 42 °C durante 12-16 horas, seguido de lavado dos veces a 55 °C usando un tampón de lavado de 1X SSC, 0,5 % de SDS. Véase también Sambrook *et al.*, *supra*, pág. 9.50-9.55.

El término “porcentaje de identidad de secuencia” en el contexto de secuencias de ácido nucleico significa el porcentaje de residuos cuando se compara una primera secuencia contigua y se alinea para correspondencia máxima con una segunda secuencia contigua. La longitud de la comparación de identidad de secuencia puede ser en un tramo de al menos aproximadamente 9 nucleótidos, habitualmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos, más habitualmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más típicamente al menos aproximadamente 32 nucleótidos, y preferiblemente al menos aproximadamente 36, 48 o más nucleótidos. Hay una serie de diferentes algoritmos conocidos en la materia que pueden usarse para medir la identidad de secuencia nucleotídica. Por ejemplo, las secuencias nucleotídicas pueden compararse usando FASTA, Gap o BESTFIT, que son programas del Wisconsin Package versión 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que incluye, p.ej., los programas FASTA2 y FASTA3, proporciona los alineamientos y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones de mejor superposición entre las secuencias de consulta y búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132: 185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266: 227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276: 71-84 (1998)). A menos que se especifique otra cosa, se usan los parámetros por defecto para un programa o algoritmo particular. Por ejemplo, puede determinarse el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácido nucleico usando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación), o usando Gap con sus parámetros por defecto como se proporciona en GCG versión 6.1.

La referencia a una secuencia de “polinucleótido” o “ácido nucleico” engloba su complemento a menos que se especifique otra cosa. Por tanto, la referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debería entenderse que engloba su hebra complementaria, con su secuencia complementaria.

El término “similitud sustancial” o “similitud de secuencia sustancial”, cuando se hace referencia a un ácido nucleico o fragmento del mismo, significa que, cuando se alinea óptimamente con las inserciones o deleciones nucleotídicas apropiadas con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), hay identidad de secuencia nucleotídica en al menos aproximadamente un 85 %, preferiblemente al menos aproximadamente un 90 %, y más preferiblemente al menos aproximadamente un 95, 96, 97, 98 o 99 % de las bases nucleotídicas, medido mediante cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se discute anteriormente.

Como se aplica a los polipéptidos, el término “identidad sustancial”, “porcentaje de identidad” o “% idéntico” significa que las dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de hueco por defecto como se suministran con los programas, comparten al menos un 70, 75 u 80 % de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 90 o 95 % de identidad de secuencia, y más preferiblemente al menos un 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia. Las posiciones de residuo que no son idénticas pueden diferir por sustituciones aminoacídicas conservativas. Una “sustitución aminoacídica conservativa” es aquella en que un residuo aminoacídico se sustituye por otro residuo aminoacídico que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (p.ej., carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución aminoacídica conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En casos en que dos o más secuencias aminoacídicas difieran entre sí por sustituciones conservativas, puede ajustarse el porcentaje de identidad de secuencia al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los especialistas en la materia. Véase, p.ej., Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243: 307-31 (1994). Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales hidroxialifáticas: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina.

La identidad de secuencia para polipéptidos se mide típicamente usando software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteína empareja las secuencias usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones aminoacídicas conservativas. Por ejemplo, el GCG contiene programas tales como “Gap” y “BESTFIT” que pueden usarse con parámetros por defecto, como se especifica con los programas, para determinar la homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y un mutante de la misma. Véase, p.ej., GCG versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas pueden compararse también usando FASTA que usa los parámetros por defecto o recomendados, véase GCG versión 6.1. (Universidad de Wisconsin WI). FASTA (p.ej., FASTA2 y FASTA3) proporciona los

alineamientos y el porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de mejor superposición entre las secuencias de consulta y búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132: 185-219 (2000)). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia descrita en la presente memoria con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente blastp o tblastn, usando parámetros por defecto como se suministran con los programas. Véanse, p.ej. Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990); Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402 (1997). La longitud de las secuencias polipeptídicas comparadas por homología será generalmente de al menos aproximadamente 16 residuos aminoacídicos, habitualmente de al menos aproximadamente 20 residuos, más habitualmente al menos aproximadamente 24 residuos, típicamente al menos aproximadamente 28 residuos, y preferiblemente más de aproximadamente 35 residuos. Cuando se busca en una base de datos que contiene secuencias de un gran número de organismos diferentes, es preferible comparar secuencias aminoacídicas.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado, que incluye tratamiento o prevención profiláctica de afecciones neoplásicas. Ha de observarse que los valores de dosificación pueden variar con la gravedad de la afección para aliviar. Ha de entenderse adicionalmente que, para cualquier sujeto particular, deberían ajustarse los regímenes de dosificación específicos con el tiempo según la necesidad individual y el criterio médico de la persona que administre o supervise la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en la presente memoria son solo ejemplares y no se pretende que limiten el alcance de la composición reivindicada. Igualmente, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o porción de anticuerpo puede variar según factores tales como el estado patológico, edad, sexo y peso del individuo, la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo de desencadenar una respuesta deseada en el individuo y la vía de administración deseada de la formulación de anticuerpo. Es una cantidad terapéuticamente eficaz también aquella en que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción de anticuerpo está contrarrestado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" con fines de tratamiento incluye cualquier sujeto, y es preferiblemente un sujeto que está necesitado de tratamiento de una afección neoplásica. Con fines de prevención, el sujeto es cualquier sujeto, y es preferiblemente un sujeto que tiene riesgo de, o está predispuesto a, desarrollar una afección neoplásica. El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos, p.ej., procariotas y eucariotas. Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, p.ej., seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales transgénicos no humanos. El sujeto puede ser un ser humano.

Como se usan en la presente memoria, los términos "neoplasia" y "afecciones neoplásicas", usados intercambiamente en la presente memoria, hacen referencia a un nuevo crecimiento celular como resultado de la pérdida de sensibilidad a los controles de crecimiento normal, p.ej., a crecimiento celular "neoplásico". Neoplasia se usa también intercambiamente en la presente memoria con el término "cáncer" y, con fines de la presente invención, cáncer es un subtipo de neoplasia. Como se usa en la presente memoria, el término "afección neoplásica" engloba también otras anomalías celulares, tales como hiperplasia, metaplasia y displasia. Los términos neoplasia, metaplasia, displasia e hiperplasia pueden usarse intercambiamente en la presente memoria y hacen referencia en general a células que experimentan un crecimiento celular anormal.

Como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento" hace referencia tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en el que el objeto es prevenir o retardar (reducir) la afección o afección patológica diana. Los necesitados de tratamiento incluyen aquellos ya con la afección así como aquellos con tendencia a tener la afección o aquellos en que se va a prevenir la afección.

Cuando se presentan elementos de la presente invención o de una realización o realizaciones preferidas de la misma, los artículos "un", "una", "el/la" y "dicho/a" pretenden significar que hay más uno o más de los elementos. Los términos "comprender", "comprenden", "comprende", "incluir" y "tener" se pretende que sean inclusivos y significan que puede haber elementos adicionales a los elementos enumerados.

#### **Anticuerpos anti-CTLA-4:**

De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto que la estabilidad de ciertos anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 que se describen en la presente memoria puede mejorarse mezclando los anticuerpos anti-CTLA-4 con un agente quelante farmacéuticamente aceptable, tal como ácido etilendiaminotetraacético ("EDTA").

Aun sin desear ligarse a teoría alguna, se cree que la presencia de un agente quelante en las composiciones descritas en la presente memoria ayuda a mejorar la estabilidad del polipéptido anticuerpo al reducir la incidencia de uno o más de los siguientes: agregación, fragmentación, oxidación, inestabilidad ante congelación/descongelación, decoloración y/o desamidación de anticuerpos anti-CTLA-4. La presente invención comprende formulaciones de anticuerpo anti-CTLA-4 como se definen por las reivindicaciones que tienen una estabilidad química y/o física mejorada en comparación con composiciones de anticuerpo dadas a conocer anteriormente.

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un agente quelante farmacéuticamente aceptable, tal como EDTA, y un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 o una porción de unión a

antígeno del mismo. Las composiciones de anticuerpo anti-CTLA-4 líquidas anteriormente mencionadas que comprenden un agente quelante pueden incluir excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales incluyendo, pero sin limitación, uno o más excipientes que se eligen de tampones, antioxidantes, agentes de tonicidad, tensioactivos y mezclas de los mismos.

5 Se describen en la presente memoria formulaciones novedosas de anticuerpos anti-CTLA-4. Como se usa en la presente memoria, la frase "anticuerpo anti-CTLA-4" hace referencia a cualquier anticuerpo, o cualquier porción del mismo, que sea capaz de unirse a cualquier porción del polipéptido proteína asociada a linfocitos T citotóxicos 4 ("CTLA-4"), que puede estar presente en o aislarse de cualquier animal. El polipéptido CTLA-4 puede ser un polipéptido CTLA-4 humano.

10 Los anticuerpos anti-CTLA-4 adecuados para uso como se describe en la presente memoria pueden elegirse de anticuerpos policlonales o monoclonales. En ciertos aspectos, el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 puede ser un anticuerpo de murino, quimérico, humanizado o humano. El anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 puede ser un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 humano.

15 Los anticuerpos anti-CTLA-4 que son adecuados para uso como se describe en la presente memoria incluyen aquellos anticuerpos anti-CTLA-4 y procedimientos para prepararlos que se describen en la patente de EE.UU. nº 6.682.736 de Hanson, *et al.*, presentada el 23 de diciembre de 1999. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-CTLA-4 que son adecuados para uso en la presente memoria incluyen también aquellos anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 que tienen las secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera del anticuerpo designado 11.2.1 en la patente de EE.UU. número 6.682.736. Los anticuerpos anti-CTLA-4 que son adecuados para uso descritos en la presente memoria pueden incluir aquellos anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 que tienen las secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera de los anticuerpos ticilimumab e ipilimumab. Los anticuerpos anti-CTLA-4 que son adecuados para uso como se describe en la presente memoria incluyen aquellos anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 que tienen las secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera del anticuerpo ticilimumab.

25 Como se usa en la presente memoria, un anticuerpo al que se hace referencia por el número tiene las mismas secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera que un anticuerpo monoclonal que se obtiene a partir del hibridoma del mismo número. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 11.2.1 tiene las mismas secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera que el obtenido a partir del hibridoma 11.2.1. Por tanto, la referencia al anticuerpo 11.2.1 incluye el anticuerpo ticilimumab™, que tiene las secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera mostradas en las SEQ ID NO. 2 y 4 y el dominio variable de cadena pesada mostrado en la SEQ ID NO.5 y el dominio variable de cadena ligera mostrado en la SEQ ID NO.6. Incluye también un anticuerpo que carece de una lisina terminal en la cadena pesada, ya que esta se pierde normalmente en una proporción de anticuerpos durante la fabricación.

35 Además, dichos anticuerpos anti-CTLA-4 pueden elegirse basándose en diferencias en las secuencias aminoacídicas en la región constante de sus cadenas pesadas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden elegirse de la clase de IgG, que tienen cadenas pesadas de tipo "gamma". La clase y subclase de los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la materia. En general, la clase y subclase de un anticuerpo pueden determinarse usando anticuerpos que sean específicos de una clase y subclase de anticuerpo particular. Dichos anticuerpos están comercialmente disponibles. La clase y subclase pueden determinarse por ELISA o transferencia Western, así como otras técnicas. Como alternativa, la clase y subclase pueden determinarse secuenciando todos o una porción de los dominios constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras de los anticuerpos, comparando sus secuencias aminoacídicas con las secuencias aminoacídicas conocidas de las diversas clases y subclases de inmunoglobulinas y determinando la clase y subclase de los anticuerpos.

45 El anticuerpo anti-CTLA-4 puede ser una molécula de IgG, IgM, IgE, IgA o IgD. El anticuerpo anti-CTLA-4 puede ser una IgG y puede ser de una subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Sin embargo, como se apreciará, generalmente no es deseable destruir las células que expresan CTLA-4. En lugar de ello, se desea generalmente inhibir simplemente la unión de CTLA-4 a sus ligandos para mitigar la regulación negativa de linfocitos T. Uno de los mecanismos principales mediante el cual los anticuerpos destruyen células es mediante la fijación de complemento y la participación en la CDC. La región constante de un anticuerpo desempeña un papel importante con relación a la capacidad del anticuerpo de fijar el complemento y particular en la CDC. Por tanto, generalmente se selecciona el isotipo de un anticuerpo para proporcionar la capacidad de fijación de complemento o no. En el caso de la presente divulgación, generalmente, como se menciona anteriormente, generalmente no se prefiere utilizar un anticuerpo que destruya las células. Hay una serie de isotipos de anticuerpos que son capaces de fijación de complemento y CDC incluyendo, sin limitación, los siguientes: IgM de murino, IgG2a de murino, IgG2b de murino, IgG3 de murino, IgM humana, IgG1 humana e IgG3 humana. En contraposición, los isotipos preferidos que son capaces de fijación de complemento y CDC incluyen, sin limitación, IgG2 humana e IgG4 humana. Además de las diferencias en la secuencia de cadena pesada, los anticuerpos de IgG difieren en sus subclases basándose en el número de enlaces disulfuro y la longitud de la región de bisagra. Por ejemplo, la subclase IgG2 tiene varias diferencias distintas de las demás subclases. Las subclases IgG2 e IgG4 son conocidas por tener 4 enlaces disulfuro en su región de bisagra, mientras que IgG1 tiene 2 e IgG3 tiene 11 puentes disulfuro. Otras diferencias de los anticuerpos de IgG2 incluyen su capacidad reducida de cruzar la placenta y la incapacidad de los anticuerpos de IgG2 de unirse al receptor Fc de

linfocitos. Por tanto, el anticuerpo anti-CTLA-4 H puede ser de subclase IgG2 o IgG4. El anticuerpo anti-CTLA-4 puede ser también de subclase IgG2.

Los anticuerpos anti-CTLA-4 adecuados pueden elegirse basándose en diferencias en las secuencias aminoacídicas de sus cadenas pesadas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en la presente memoria pueden tener cadenas pesadas de tipo gamma humanas que utilizan cualquiera de los siguientes genes de línea germinal V<sub>H</sub> humana: V<sub>H</sub>1, V<sub>H</sub>2, V<sub>H</sub>3, V<sub>H</sub>4 o V<sub>H</sub>5. Los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden utilizar el gen de línea germinal V<sub>H</sub>3 humano. Los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden utilizar el gen de línea germinal V<sub>H</sub>3 humano y la región variable de cadena pesada DP-50 o DP-46 humana, y también los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden utilizar la región variable de cadena pesada DP-50 humana. Se hace referencia también al gen DP-50 como un gen de la familia de V<sub>H</sub> 3-33. Se hace referencia también al gen DP-46 como un gen de la familia V<sub>H</sub> 3-30.3. Los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden utilizar un gen D<sub>H</sub> humano que se selecciona de D1-26, DIR4 y DIR3 y los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden utilizar un gen D<sub>H</sub> humano D1-26. Los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden utilizar un gen J<sub>H</sub> humano que se selecciona de J<sub>H</sub>4 y J<sub>H</sub>6 y, en otras realizaciones, los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden utilizar también el gen J<sub>H</sub> humano J<sub>H</sub>6.

Los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden elegirse basándose en las diferencias en las secuencias aminoacídicas de sus cadenas ligeras. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CTLA-4 adecuados pueden tener cadenas ligeras lambda o cadenas ligeras kappa. Sin embargo, los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en la presente memoria pueden tener cadenas ligeras kappa. Cuando el anticuerpo anti-CTLA-4 comprende una cadena ligera kappa, el polinucleótido que codifica el dominio variable de la cadena ligera puede comprender un gen V<sub>K</sub> L5, O12, L2, 83, L15 o A27 humano y un gen J<sub>K</sub>1, J<sub>K</sub>2, J<sub>K</sub>3, J<sub>K</sub>4 o J<sub>K</sub>5 humano. Cuando el anticuerpo comprende una cadena ligera kappa, el dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) puede estar codificado en parte por un gen V<sub>K</sub>O12 o V<sub>K</sub>A27 humano y un gen J<sub>K</sub>3 o J<sub>K</sub>4 humano. El dominio variable de cadena ligera puede estar codificado por los genes V<sub>K</sub>O12/J<sub>K</sub>3 humanos.

Además, el anticuerpo puede comprender una secuencia aminoacídica de cadena pesada que comprende secuencias aminoacídicas de CDR humanas derivadas del gen V<sub>H</sub> 3-30 o 3-33, o sustituciones conservativas o mutaciones somáticas en las mismas. Se entiende que el gen V<sub>H</sub> 3-33 codifica de FR1 a FR3 de la región variable de cadena pesada de una molécula de anticuerpo. Por tanto, la divulgación engloba un anticuerpo que comparte al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 %, todavía más preferiblemente al menos un 91 %, aún más preferiblemente al menos un 94 %, todavía más preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 97 %, aún más preferiblemente al menos un 98 %, todavía más preferiblemente al menos un 99 % y lo más preferiblemente un 100 % de identidad con la secuencia de FR1 a FR3 del anticuerpo ticilimumab.

El anticuerpo puede comprender adicionalmente regiones CDR en su cadena ligera derivadas del gen A27 o O12 o puede comprender las regiones CDR del anticuerpo ticilimumab.

El anticuerpo puede inhibir la unión entre CTLA-4 y B7-1, B7-2 o ambos. Preferiblemente, el anticuerpo puede inhibir la unión a B7-1 con una C<sub>I50</sub> de aproximadamente 100 nM o menor, más preferiblemente de aproximadamente 10 nM o menor, por ejemplo de aproximadamente 5 nM o menor, todavía más preferiblemente de aproximadamente 2 nM o menor, o aún más preferiblemente, por ejemplo, de aproximadamente 1 nM o menor. Igualmente, el anticuerpo puede inhibir la unión a B7-2 con una C<sub>I50</sub> de aproximadamente 100 nM o menor, más preferiblemente 10 nM o menor, por ejemplo aún más preferiblemente de aproximadamente 5 nM o menor, todavía más preferiblemente de aproximadamente 2 nM o menor, o aún más preferiblemente de aproximadamente 1 nM o menor.

Adicionalmente, el anticuerpo anti-CTLA-4 puede tener una afinidad de unión por CTLA-4 de aproximadamente 10<sup>-8</sup> o mayor afinidad, más preferiblemente de aproximadamente 10<sup>-9</sup> o mayor afinidad, más preferiblemente de aproximadamente 10<sup>-10</sup> o mayor afinidad, y aún más preferiblemente de aproximadamente 10<sup>-11</sup> o mayor afinidad.

El anticuerpo anti-CTLA4 incluye un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo que tiene las secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera del anticuerpo ticilimumab. Adicionalmente, el anticuerpo anti-CTLA4 puede competir por la unión con el anticuerpo ipilimumab.

El anticuerpo puede competir preferiblemente de forma cruzada con un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena pesada y ligera, una secuencia de cadena pesada variable y de cadena ligera variable y/o las secuencias de CDR pesadas y ligeras del anticuerpo ticilimumab. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse al epítipo al que se une un anticuerpo que tiene secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera, secuencias variables y/o secuencias de CDR del anticuerpo ticilimumab. El anticuerpo puede competir de forma cruzada con un anticuerpo que tiene secuencias de cadena pesada y ligera, o secuencias de unión a antígeno, de MDX-D010.

Puede practicarse la divulgación usando un anticuerpo anti-CTLA-4 que comprende una cadena pesada que comprende las secuencias aminoacídicas de CDR-1, CDR-2 y CDR-3, y una cadena ligera que comprende las secuencias aminoacídicas de CDR-1, CDR-2 y CDR-3 del anticuerpo ticilimumab, o secuencias que tienen cambios de las secuencias de CDR seleccionados del grupo consistente en cambios conservativos, en los que los cambios conservativos se seleccionan del grupo consistente en el reemplazo de residuos no polares por otros residuos no polares, el reemplazo de residuos cargados polares por otros residuos no cargados polares, el reemplazo de residuos cargados polares por otros residuos cargados polares y la sustitución de residuos estructuralmente similares; sustituciones no conservativas en las que las sustituciones no conservativas se seleccionan del grupo

consistente en sustitución de residuos cargados polares por residuos no cargados polares y la sustitución de residuos no polares por residuos polares, adiciones y deleciones.

5 El anticuerpo puede contener menos de 10, 7, 5 o 3 cambios aminoacídicos de la secuencia de línea germinal en las regiones estructurales o CDR. El anticuerpo puede contener también menos de 5 cambios aminoacídicos en las regiones estructurales y menos de 10 cambios en las regiones CDR. El anticuerpo puede contener menos de 3 cambios aminoacídicos en las regiones estructurales y menos de 7 cambios en las regiones CDR. Los cambios en las regiones estructurales pueden ser conservativos y aquellos en las regiones CDR pueden ser mutaciones somáticas.

10 El anticuerpo puede compartir un 100 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia con la cadena pesada y la cadena ligera, o con la cadena pesada o la cadena ligera, separadamente, del anticuerpo ticilimumab.

15 El anticuerpo puede compartir al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, aún más preferiblemente al menos un 90 %, todavía más preferiblemente al menos un 94 %, más preferiblemente al menos un 95 %, aún más preferiblemente al menos un 99 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia con las secuencias completas de cadena pesada y ligera, o con la cadena pesada o ligera, separadamente, de las secuencias de línea germinal V<sub>K</sub> A27, línea germinal V<sub>K</sub> O12 y línea germinal DP50 (que es un alelo del locus del gen V<sub>H</sub> 3-33). El anticuerpo puede compartir también un 100 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia con la secuencia de cadena pesada de la línea germinal DP50 y/o con la secuencia de cadena ligera de la línea germinal A27 o la línea germinal O12.

20 El anticuerpo puede compartir al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, aún más preferiblemente al menos un 90 %, todavía más preferiblemente al menos un 94 %, preferiblemente al menos un 95 %, aún más preferiblemente al menos un 99 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia (p.ej., aminoacídica, de ácido nucleico o ambas) con las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera o con la secuencia de región variable de cadena pesada o ligera, separadamente, de las secuencias del anticuerpo 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, ticilimumab, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1, 12.9.1.1 e ipilimumab. Aún más preferiblemente, el anticuerpo comparte un 100 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia con las secuencias de región variable de cadena pesada y cadena ligera, o con la secuencia de cadena pesada o cadena ligera, separadamente, de un anticuerpo seleccionado del anticuerpo 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, ticilimumab, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1, 12.9.1.1 e ipilimumab.

30 El anticuerpo puede compartir al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, aún más preferiblemente al menos un 90 %, todavía más preferiblemente al menos un 94 %, más preferiblemente al menos un 95 %, aún más preferiblemente al menos un 99 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia con la secuencia de región variable de cadena pesada de la secuencia variable de cadena pesada de la línea germinal DP50 (que es un alelo del locus del gen V<sub>H</sub> 3-33) o con la secuencia variable de cadena ligera de la línea germinal V<sub>K</sub> A27 o la línea germinal V<sub>K</sub> O12. Aún más preferiblemente, la secuencia de región de cadena pesada de anticuerpo comparte un 100 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia con la secuencia de la línea germinal DP50 o con la secuencia de cadena ligera de la línea germinal A27 o la línea germinal O12.

40 El anticuerpo puede compartir al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, aún más preferiblemente al menos un 90 %, todavía más preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia de las secuencias de cadena pesada, cadena ligera o ambas de FR1 a FR4 con las secuencias de la región FR1 a FR4 del anticuerpo ticilimumab. Aún más preferiblemente, el anticuerpo comparte un 100 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia de las secuencias pesada, ligera o ambas de FR1 a FR4 con el anticuerpo ticilimumab.

45 El anticuerpo puede compartir al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, aún más preferiblemente al menos un 90 %, todavía más preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 % y lo más preferiblemente aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia de las secuencias de cadena pesada de FR1 a FR3 con las secuencias de la región FR1 a FR3 de la línea germinal DP50.

50 El anticuerpo puede compartir al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, aún más preferiblemente al menos un 90 %, todavía más preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 % y lo más preferiblemente aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia de las secuencias de cadena ligera de FR1 a FR4 con las secuencias de la región FR1 a FR4 de la línea germinal V<sub>K</sub> A27 o la línea germinal V<sub>K</sub> O12.

55 El anticuerpo puede compartir al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, aún más preferiblemente al menos un 90 %, todavía más preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia con las secuencias de cadena pesada, cadena ligera o ambas, CDR-1, CDR-2 y CDR-3 del anticuerpo ticilimumab. Aún más preferiblemente, el anticuerpo comparte un 100 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia de las secuencias de cadena pesada, ligera o ambas, CDR-1, CDR-2 y CDR-3 con el anticuerpo ticilimumab.

El anticuerpo puede compartir al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, aún más preferiblemente al menos un 90 %, todavía más preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 % y lo más

preferiblemente aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia de las secuencias de CDR-1 y CDR-2 de cadena pesada con las secuencias de CDR-1 y CDR-2 de la línea germinal DP50.

5 El anticuerpo puede compartir al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, aún más preferiblemente al menos un 90 %, todavía más preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 % y lo más preferiblemente aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia de las secuencias de CDR-1, CDR-2 y CDR-3 de cadena ligera con las secuencias CDR-1, CDR-2 y CDR-3 de la línea germinal V<sub>K</sub> A27 o la línea germinal V<sub>K</sub> O12.

El anticuerpo anti-CTLA-4 puede ser el anticuerpo conocido como ticilimumab.

10 La Tabla 1 enumera la derivación génica de línea germinal humana de cadena pesada y cadena ligera para el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 11.2.1 (concretamente., ticilimumab).

Tabla 1:

Clon	ADN de cadena pesada				ADN de cadena ligera		
	SEQ ID NO:	V <sub>H</sub>	D <sub>H</sub>	J <sub>H</sub>	SEQ ID NO:	V <sub>K</sub>	J <sub>K</sub>
11.2.1	1 (ADNc) (completo)	DP-50 (3-33)	D1-26	6	3 (ADNc) (completo)	012	3

15 Se generaron algunos anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en la presente memoria con un sesgo hacia la utilización de la región variable de cadena pesada de DP-50. Se hace referencia también al gen DP-50 como un gen de la familia de V<sub>H</sub> 3-33. En ratones Xenomouse™, hay más de 30 genes variables de cadena pesada funcionales distintos con los que generar anticuerpos. Por lo tanto, el sesgo es indicativo de un motivo de unión preferido de la interacción anticuerpo-antígeno con respecto a las propiedades combinadas de unión al antígeno y actividad funcional.

20 El anticuerpo puede ser un anticuerpo monocatenario (scFv) en que los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> están apareados formando moléculas monovalentes a través de un ligador sintético que les posibilita conformarse como una cadena proteica única. Bird *et al.*, Science 242: 423-426 (1988) y Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988). Los anticuerpos pueden ser diacuerpos, concretamente son anticuerpos divalentes en que los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero usando un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena, forzando así a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Véanse, p.ej., Holliger P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) y Poljak R. J. *et al.*, Structure 2: 1121-1123 (1994). Una o más CDR de un anticuerpo descrito en la presente memoria pueden incorporarse a una molécula covalente o no covalentemente para hacerla una inmunoadhesina que se une específicamente a CTLA-4. Las CDR pueden incorporarse como parte de una cadena polipeptídica mayor, pueden enlazarse covalentemente con otra cadena polipeptídica o pueden incorporarse no covalentemente.

30 El anticuerpo anti-CTLA-4 puede tener una selectividad (o especificidad) por CTLA-4 que es al menos 100 veces mayor que su selectividad por cualquier otro polipéptido. El anticuerpo anti-CTLA-4 puede no exhibir una unión específica apreciable a ninguna otra proteína distinta de CTLA-4. Puede determinarse la selectividad del anticuerpo anti-CTLA-4 por CTLA-4 usando procedimientos bien conocidos en la materia siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva. Por ejemplo, puede determinarse la selectividad usando transferencia Western, FACS, ELISA o RIA. Por tanto, el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 puede ser capaz de unirse específicamente a CTLA-4.

40 La lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente memoria puede no estar presente. La lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente memoria puede no estar presente. En ciertos aspectos descritos en la presente memoria, el anticuerpo anti-CTLA-4 no comprende típicamente un polipéptido señal, porque el polipéptido señal se elimina generalmente durante las modificaciones postraduccionales. En diversos aspectos descritos en la presente memoria, una o ambas de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anti-CTLA-4 puede incluir una secuencia señal (o una porción de secuencia señal). En otros aspectos descritos en la presente memoria, ni la cadena pesada ni la ligera de los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden incluir una secuencia señal.

45 La Tabla 2 enumera los identificadores de secuencia (SEQ ID NO) de los ácidos nucleicos que codifican la región variable de las cadenas pesada y ligera y de las correspondientes secuencias aminoacídicas predichas del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 11.2.1.

Tabla 2:

ANTICUERPO ANTI-CTLA-4 HUMANO 11.2.1	
AcM	IDENTIFICADOR DE SECUENCIA (SEQ ID NO)
	Pesada   Ligera

	ADNc	Aminoácido	ADNc	Aminoácido
11.2.1 (completo)	1	2	3	4

5 La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica de  $V_L$  del anticuerpo monoclonal 11.2.1 (SEQ ID NO: 4) o una porción de la misma. Dicha porción puede comprender al menos la región CDR2. El ácido nucleico puede codificar la secuencia aminoacídica de las CDR de cadena ligera de dicho anticuerpo. Dicha porción puede ser una porción contigua que comprende CDR1-CDR3. La secuencia aminoacídica de CDR1 de cadena ligera puede indicarse por la SEQ ID NO: 10, la secuencia aminoacídica de CDR2 de cadena ligera por la SEQ ID NO: 11 y la secuencia aminoacídica de CDR3 de cadena ligera por la SEQ ID NO: 12.

10 La molécula de ácido nucleico puede codificar una secuencia aminoacídica de  $V_L$  que es al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia aminoacídica de  $V_L$  de SEQ ID NO: 4. La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4, o una porción de la misma. Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria pueden incluir ácidos nucleicos que hibridan en condiciones altamente rigurosas, tales como aquellas descritas en la presente memoria, con una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia aminoacídica de cadena ligera de SEQ ID NO: 4.

15 La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica al menos una porción de la secuencia aminoacídica de  $V_H$  de 11.2.1 (SEQ ID NO: 2) o teniendo dicha secuencia mutaciones aminoacídicas conservativas y/o un total de tres o menos sustituciones aminoacídicas no conservativas. En diversos aspectos, la secuencia puede codificar una o más regiones CDR, preferiblemente una región CDR3, las tres regiones CDR, una porción contigua que incluye CDR1-CDR3, o la región de  $V_H$  completa. En ciertos aspectos, la secuencia aminoacídica de CDR1 de cadena pesada se indica por la SEQ ID NO: 7, la secuencia aminoacídica de CDR2 de cadena pesada por la SEQ ID NO: 8 y la secuencia aminoacídica de CDR3 de cadena pesada por la SEQ ID NO: 9.

20 La molécula de ácido nucleico puede codificar una secuencia aminoacídica de  $V_H$  que es al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia aminoacídica de  $V_H$  de SEQ ID NO: 2. La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 o una porción de la misma. Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria pueden incluir ácidos nucleicos que hibridan en condiciones altamente rigurosas, tales como aquellas descritas anteriormente, con una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica de cadena pesada de SEQ ID NO: 2.

25 En ciertos aspectos, se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende al menos un anticuerpo humano aislado que se une a CTLA-4, en la que el anticuerpo comprende una secuencia aminoacídica de  $V_H$  que utiliza un gen de línea germinal  $V_H$  3-33 humano y un excipiente farmacéuticamente aceptable que comprende un agente quelante.

30 En otros aspectos, se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende al menos un anticuerpo humano aislado que se une a CTLA-4, en la que el anticuerpo comprende una secuencia aminoacídica de cadena pesada con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y una secuencia aminoacídica de cadena ligera con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4.

35 En otros aspectos, se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende al menos un anticuerpo humano aislado que se une a CTLA-4, en la que el anticuerpo comprende una secuencia aminoacídica de cadena pesada con al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y una secuencia aminoacídica de cadena ligera con al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4.

40 En otros aspectos, se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende al menos un anticuerpo humano aislado que se une a CTLA-4, en la que el anticuerpo comprende una secuencia aminoacídica de cadena pesada con al menos un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y una secuencia aminoacídica de cadena ligera con al menos un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4.

45 En aún otros aspectos, el anticuerpo puede comprender una secuencia aminoacídica de cadena pesada que comprende la región variable de SEQ ID NO: 2 y una secuencia aminoacídica de cadena ligera que comprende la región variable de SEQ ID NO: 4. En aspectos adicionales, el anticuerpo puede comprender una secuencia aminoacídica de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 5 y una secuencia aminoacídica de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 6. En aspectos adicionales, el anticuerpo puede comprender una secuencia aminoacídica de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2 y una secuencia aminoacídica de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 4. En aún otros aspectos, el anticuerpo puede comprender una secuencia aminoacídica de  $V_H$  que comprende las secuencias FR1, FR2 y FR3 humanas que utilizan un gen de la familia de  $V_H$  3-33 humano enlazado operativamente en fase con una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3.

El anticuerpo anti-CTLA-4 puede ser ticilimumab (también conocido como CP-675.206), que tiene las secuencias aminoacídicas de cadena pesada y ligera del anticuerpo ticilimumab.

Los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden unirse específicamente a un epítipo conformacional en CTLA-4 humano. Los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden inhibir el crecimiento tumoral humano después de la administración a un sujeto.

5 **Preparación de formulaciones de anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4:**

El anticuerpo anti-CTLA-4 se formula típicamente como una composición farmacéutica para administración parenteral a un sujeto. La composición farmacéutica puede ser una composición líquida.

10 Las composiciones descritas en la presente memoria implican uno o más anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 descritos en la presente memoria en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables, que comprenden histidina y/o un agente quelante. Las formulaciones líquidas descritas en la presente memoria implican uno o más anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 descritos en la presente memoria en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden histidina y/o un agente quelante.

15 El término "composición farmacéutica" hace referencia a preparaciones que están en tal forma que permite que sea eficaz la actividad biológica de los ingredientes activos. Son "excipientes farmacéuticamente aceptables" (vehículos, aditivos) aquellos que pueden administrarse razonablemente (concretamente con seguridad) a un sujeto, proporcionando una dosis eficaz del ingrediente activo empleado. El término "excipiente" o "portador" como se usa en la presente memoria hace referencia a una sustancia inerte que se usa comúnmente como diluyente, vehículo, conservante, aglutinante o agente estabilizante para fármacos. Como se usa en la presente memoria, el término "diluyente" hace referencia a un disolvente farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para administración a un ser humano) y es útil para la preparación de las formulaciones líquidas de la presente memoria. Los diluyentes ejemplares incluyen, pero sin limitación, agua estéril y agua bacteriostática para inyecciones (ABPI).

20 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 y un agente quelante farmacéuticamente aceptable. Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 y EDTA. Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 y DTPA.

25 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, un agente quelante farmacéuticamente aceptable y un tampón farmacéuticamente aceptable. Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, un agente quelante farmacéuticamente aceptable e histidina. Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, EDTA e histidina. Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, DTPA e histidina.

30 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, un agente quelante farmacéuticamente aceptable y un agente de tonicidad farmacéuticamente aceptable. Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, un agente quelante farmacéuticamente aceptable y trehalosa. Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, EDTA y trehalosa. Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, DTPA y trehalosa.

35 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, un agente quelante farmacéuticamente aceptable y un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, EDTA y un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, DTPA y un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, un agente quelante farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo consistente en EDTA y DTPA y polisorbato 80.

40 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, un tampón farmacéuticamente aceptable y un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, histidina y un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, histidina y polisorbato 80.

45 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, un agente quelante farmacéuticamente aceptable, un tampón farmacéuticamente aceptable y un tensioactivo farmacéuticamente aceptable.

50 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, un agente quelante farmacéuticamente aceptable, un tampón farmacéuticamente aceptable y un agente de tonicidad farmacéuticamente aceptable.

55 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, un agente quelante farmacéuticamente aceptable, un tampón farmacéuticamente aceptable y un agente de tonicidad farmacéuticamente aceptable.

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, un agente quelante farmacéuticamente aceptable, un tampón farmacéuticamente aceptable, un tensioactivo farmacéuticamente aceptable y un agente de tonicidad farmacéuticamente aceptable.

5 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 e histidina.

El anticuerpo anti-CTLA-4 presente en la composición puede ser como se describe anteriormente en esta solicitud. La composición puede comprender un anticuerpo anti-CTLA-4 que comprende una secuencia aminoacídica de  $V_L$  que es un 90, 95 o 99 % idéntica a la secuencia aminoacídica de  $V_L$  mostrada en la SEQ ID NO: 4, y puede comprender adicionalmente una secuencia aminoacídica de  $V_H$  que es un 90, 95 o 99 % idéntica a la secuencia aminoacídica de  $V_H$  mostrada en la SEQ ID NO: 2. La composición puede comprender también un anticuerpo anti-CTLA-4 que es el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 11.2.1.

15 El anticuerpo anti-CTLA-4 presente en las composiciones farmacéuticas líquidas puede ser como se describe anteriormente en esta solicitud. Las composiciones farmacéuticas líquidas pueden comprender un anticuerpo anti-CTLA-4 que comprende una secuencia aminoacídica de  $V_L$  que es un 90, 95 o 99 % idéntica a la secuencia aminoacídica de  $V_L$  mostrada en la SEQ ID NO: 4, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica de  $V_H$  que es un 90, 95 o 99 % idéntica a la secuencia aminoacídica de  $V_H$  mostrada en la SEQ ID NO: 2. La composición farmacéutica líquida puede comprender un anticuerpo anti-CTLA-4 que es el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 11.2.1.

20 La concentración del anticuerpo anti-CTLA-4 en las composiciones farmacéuticas líquidas descritas en la presente memoria es generalmente de al menos aproximadamente 0,1 miligramos por mililitro (mg/ml) o mayor, al menos de aproximadamente 1,0 mg/ml o mayor, al menos de aproximadamente 10 mg/ml o mayor, al menos de aproximadamente 50 mg/ml o mayor, al menos de aproximadamente 100 mg/ml o mayor o de al menos aproximadamente 200 mg/ml o mayor. La concentración de anticuerpo anti-CTLA-4 puede oscilar generalmente de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 70 mg/ml, de aproximadamente 2,0 mg/ml a aproximadamente 65 mg/ml, de aproximadamente 5,0 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 35 mg/ml, de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml o es de aproximadamente 20 mg/ml. La concentración de anticuerpo anti-CTLA-4 en la composición farmacéutica líquida puede oscilar de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. Pueden usarse concentraciones de anticuerpo mayores cuando la composición se pretende para suministro subcutáneo.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "agente quelante" hace referencia en general a un excipiente que puede formar al menos un enlace (p.ej., covalente, iónico o de otro tipo) con un ión metálico. Un agente quelante es típicamente un ligando multidentado que puede usarse en composiciones líquidas seleccionadas como estabilizante para complejar con especies que podrían promover la inestabilidad. A menudo, los compuestos que pueden actuar como agente quelante tendrán grupos funcionales ricos en electrones. Los grupos funcionales ricos en electrones adecuados incluyen grupos ácido carboxílico, grupos hidroxilo y grupos amino. La disposición de estos grupos en ácidos aminopolicarboxílicos, ácidos hidroxipolicarboxílicos, ácidos hidroxiaminocarboxílicos y similares da como resultado restos que tienen la capacidad de unirse a metal.

35 Sin embargo, la presente divulgación no pretende estar limitada a agentes quelantes principalmente por la capacidad del agente quelante de formar enlaces con un ión metálico. Por lo tanto, la presente divulgación no pretende estar limitada a ningún mecanismo específico mediante el cual actúa el agente quelante en las formulaciones descritas en la presente memoria, y los excipientes denominados agentes quelantes en la presente memoria pueden conseguir sus propiedades mediante mecanismos que no están en absoluto relacionados con la capacidad del agente quelante de formar enlaces con un ión metálico.

40 Los agentes quelantes que son adecuados para uso como se describe en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, ácidos aminopolicarboxílicos, ácidos hidroxiaminocarboxílicos, glicinas *N*-sustituidas, ácido 2-(2-amino-2-oxoetil)aminoetanosulfónico (BES), deferoxamina (DEF), ácido cítrico, niacinamida y desoxicolatos. Los ejemplos de ácidos aminopolicarboxílicos adecuados incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido *N*-2-acetamido-2-iminodiacético (ADA), bis(aminoetil)glicoléter, ácido *N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA), ácido trans-diaminociclohexanotetraacético (DCTA), ácido glutámico y ácido aspártico. Los ejemplos de ácidos hidroxiaminocarboxílicos adecuados incluyen ácido *N*-hidroxi-etiliminodiacético (HIMDA), *N,N*-bis-hidroxi-etilglicina (bicina) y *N*-(trishidroximetilmetil)glicina (tricina). Es un ejemplo de glicina *N*-sustituida adecuada la glicilglicina. Es un ejemplo de desoxicolato adecuado el desoxicolato de sodio. Se describen también en la presente memoria mezclas de dos o más agentes quelantes.

55 Los agentes quelantes descritos en la presente memoria pueden estar presentes, cuando sea posible, como la forma de ácido libre o base libre del compuesto (p.ej., a la que se hace referencia intercambiamente en la presente memoria como "EDTA" o "edetato") o como la correspondiente forma salina (p.ej., la correspondiente sal de adición de ácido o sal de adición de base, tal como edetato de disodio). Las sales de adición de ácido adecuadas, p.ej., incluyen sales de metales alcalinos (p.ej., sales de sodio o potasio), sales de metales alcalinotérreos (p.ej.,

sales de calcio) y sales que pueden prepararse usando otros iones metálicos unidos débilmente. Como es conocido en la materia, la naturaleza de la sal y el número de cargas para neutralizar dependerá del número de grupos carboxilo presentes y del pH al que se suministre el agente quelante estabilizante. Como es también conocido en la materia, los agentes quelantes tienen potencias variables con las que se unen a los iones diana particulares. A modo de ilustración adicional, las sales de EDTA incluyen edetato de dipotasio, edetato de disodio, calcioedetato de disodio, edetato de sodio, edetato de trisodio y edetato de potasio; y es una sal de deferoxamina (DEF) adecuada el mesilato de deferoxamina (DFM).

Los agentes quelantes descritos en la presente memoria pueden estar presentes en la forma anhidra, solvatada o hidratada del compuesto o sal correspondiente. Cuando el agente quelante está en forma solvatada o hidratada, puede estar presente en estados variables de solvatación o hidratación (incluyendo, p.ej., formas anhidra, hidratada, dihidratada y trihidratada). A modo de ilustración adicional, es un hidrato adecuado de EDTA el EDTA de disodio dihidratado; y las formas adecuadas de ácido cítrico incluyen ácido cítrico anhidro, ácido cítrico monohidratado y citrato de trisodio dihidratado.

Los agentes quelantes adecuados usados en las composiciones de anticuerpo descritas en la presente memoria incluyen también, por ejemplo, aquellos que se unen a iones metálicos en solución para volverlos incapaces de reaccionar con el O<sub>2</sub> disponible, minimizando o evitando así la generación de radicales hidroxilo que son libres de reaccionar con y degradar el anticuerpo. Los agentes quelantes pueden reducir la formación de especies de oxígeno reducido, reducir la formación de especies ácidas (p.ej., desamidación), reducir la agregación de anticuerpos y/o reducir la fragmentación de anticuerpos en las composiciones descritas en la presente memoria. Dichos agentes quelantes pueden reducir o evitar la degradación de un anticuerpo que se formula sin la protección de un agente quelante.

Cuando se hace referencia a la concentración de un agente quelante, se pretende que la concentración enunciada represente la concentración molar de la forma de ácido libre o base libre del agente quelante. Por ejemplo, la concentración de agente quelante en ciertas composiciones farmacéuticas líquidas oscila generalmente de aproximadamente 0,01  $\mu$ M a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 10,0 mM, de aproximadamente 15  $\mu$ M a aproximadamente 5,0 mM, de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1,0 mM o de aproximadamente 0,03 mM a aproximadamente 0,5 mM. La concentración de agente quelante en la composición farmacéutica líquida puede ser de aproximadamente 0,01 mM, 0,02 mM, 0,027 mM, 0,03 mM, aproximadamente 0,04 mM, aproximadamente 0,05 mM, aproximadamente 0,06 mM, aproximadamente 0,07 mM, aproximadamente 0,10 mM, aproximadamente 0,20 mM, aproximadamente 0,26 mM, aproximadamente 0,27 mM, aproximadamente 0,30 mM, aproximadamente 0,31 mM, aproximadamente 0,34 mM, aproximadamente 0,40 mM, aproximadamente 0,50 mM o aproximadamente 1,0 mM. La concentración de agente quelante puede ser de aproximadamente 0,027 mM, aproximadamente 0,05 mM, aproximadamente 0,13 mM o aproximadamente 0,27 mM. La concentración de agente quelante puede ser de aproximadamente 0,05 mM. La concentración de agente quelante puede ser de aproximadamente 0,13 mM.

A menos que se indique otra cosa, las concentraciones enumeradas en la presente memoria son las concentraciones en condiciones ambientales (concretamente a 25 °C y presión atmosférica). Se pretende también que los intervalos intermedios de las concentraciones de agente quelante anteriormente enunciadas se describan en la presente memoria. Por ejemplo, se pretende incluir los intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores anteriormente enunciados como límites superior y/o inferior.

El agente quelante puede seleccionarse del grupo consistente en EDTA, DTPA, DFM y mezclas de los mismos. El agente quelante puede ser DFM. El agente quelante puede ser EDTA. El agente quelante puede ser DTPA. La composición farmacéutica líquida puede comprender EDTA en una cantidad que oscila generalmente de aproximadamente 0,01  $\mu$ M a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 20,0 mM, de aproximadamente 15  $\mu$ M a aproximadamente 10,0 mM, de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 5,0 mM o de aproximadamente 0,03 mM a aproximadamente 1 mM. La concentración de EDTA en la composición farmacéutica líquida puede ser de aproximadamente 0,01 mM, 0,02 mM, 0,027 mM, 0,03 mM, aproximadamente 0,04 mM, aproximadamente 0,05 mM, aproximadamente 0,06 mM, aproximadamente 0,07 mM, aproximadamente 0,10 mM, aproximadamente 0,20 mM, aproximadamente 0,26 mM, aproximadamente 0,27 mM, aproximadamente 0,30 mM, aproximadamente 0,31 mM, aproximadamente 0,34 mM, aproximadamente 0,40 mM, aproximadamente 0,50 mM o aproximadamente 1,0 mM. La concentración de EDTA puede ser de aproximadamente 0,027 mM, aproximadamente 0,05 mM, aproximadamente 0,13 mM o aproximadamente 0,27 mM. La concentración de EDTA puede ser de aproximadamente 0,05 mM. La concentración de EDTA puede ser de aproximadamente 0,13 mM. La composición farmacéutica líquida puede comprender EDTA en una cantidad de aproximadamente 0,27 mM.

Como se indica anteriormente, las composiciones descritas en la presente memoria pueden comprender opcionalmente un tampón farmacéuticamente aceptable además de un agente quelante. Como se usa en la presente memoria, el término "tampón" hace referencia a una composición añadida que permite a una formulación líquida de anticuerpo resistir a cambios del pH. El tampón añadido puede permitir a una formulación líquida de anticuerpo resistir a cambios del pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base.

Por ejemplo, puede prepararse una formulación tamponada añadiendo HCl de L-histidina (clorhidrato de L-histidina) y L-histidina en las cantidades apropiadas para llegar al pH deseado. Sin embargo, el tampón añadido puede permitir a una formulación líquida de anticuerpo resistir a cambios del pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. A modo de segundo ejemplo, puede prepararse una formulación tamponada añadiendo un ácido, tal como ácido clorhídrico, y L-histidina en las cantidades apropiadas para llegar al pH deseado.

Los ejemplos de tampones adecuados incluyen, pero sin limitación, acetato (p.ej., acetato de sodio), succinato (p.ej., succinato de sodio), gluconato, citrato (p.ej. y otros tampones de ácido orgánico incluyendo, pero sin limitación, tampones tales como aminoácidos (p.ej. histidina), ácido acético, ácido fosfórico y fosfatos, ascorbato, ácido tartárico, ácido maleico, glicina, lactato, ácido láctico, ácido ascórbico, imidazoles, ácido carbónico y bicarbonatos, ácido succínico, benzoato de sodio y benzoatos, gluconato, edetato (EDTA), acetato, malato, imidazol, tris, fosfato y mezclas de los mismos. El tampón puede ser acetato.

El tampón puede ser histidina. El material de partida histidina usado para preparar las composiciones descritas en la presente memoria puede existir en formas diferentes. Por ejemplo, la histidina puede ser una forma enantiomérica (p.ej., enantiómero L o D) o racémica de histidina, una forma de ácido libre o base libre de histidina, una forma de sal (p.ej., una sal monoclóridato, diclorhidrato, bromhidrato, sulfato o acetato) de histidina, una forma solvatada de histidina, una forma hidratada (p.ej. monohidratada) de histidina o una forma anhidra de histidina. La pureza de la base y/o sal de histidina usada para preparar las composiciones puede ser generalmente de al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 % o al menos aproximadamente un 99,5 %. Como se usa en la presente memoria, el término "pureza" en el contexto de la histidina hace referencia a la pureza química de la histidina como se entiende en la materia, p.ej., como se describe en "The Merck Index", 13ª ed., O'Neil *et al.* ed. (Merck & Co., 2001).

Cuando se hace referencia a una concentración de tampón, se pretende que la concentración enunciada represente la concentración molar de la forma de ácido libre o base libre del tampón. Por ejemplo, la concentración del tampón cuando está presente en ciertas composiciones farmacéuticas líquidas puede oscilar de aproximadamente 0,1 milimolar (mM) a aproximadamente 100 mM. La concentración de tampón puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM. La concentración de tampón puede ser de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM. La concentración de tampón puede ser de aproximadamente 1 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 55 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 65 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 85 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 95 mM o aproximadamente 100 mM. La concentración de histidina en la composición farmacéutica puede ser de aproximadamente 10 mM. La composición farmacéutica puede contener aproximadamente 10 mM de L-histidina (en forma básica). La concentración de histidina en la composición farmacéutica puede ser de aproximadamente 20 mM. La composición farmacéutica puede contener aproximadamente 20 mM de L-histidina (en forma básica). Se pretende que estén también descritos en la presente memoria los intervalos intermedios de las concentraciones de histidina anteriormente enunciadas. Por ejemplo, se pretende que estén incluidos los intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores anteriormente enunciados como límites superior y/o inferior.

En general, se usa el tampón para mantener un nivel de pH aceptable (que puede afectar a la estabilidad del anticuerpo) en la composición farmacéutica líquida. La composición farmacéutica líquida está típicamente tamponada para mantener el pH en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 8; de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7; de aproximadamente 5,0 a 6,5 o de aproximadamente 5,3 a aproximadamente 6,3. Se pretende que sean también parte de esta divulgación los intervalos intermedios de los pH anteriormente enunciados. Por ejemplo, se pretende incluir los intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores anteriormente enunciados como límites superior y/o inferior. La composición farmacéutica líquida puede estar tamponada para mantener un pH de aproximadamente 5,5. La composición farmacéutica líquida puede estar tamponada para mantener un pH de aproximadamente 6,0.

Como se indica anteriormente, las composiciones descritas en la presente memoria pueden comprender adicionalmente un agente de tonicidad farmacéuticamente aceptable además de un agente quelante. Como se usa en la presente memoria, los términos "agente de tonicidad" o "tonificante" hacen referencia a un excipiente que puede ajustar la presión osmótica de una formulación líquida de anticuerpo. El agente de tonicidad puede ajustar la presión osmótica de una formulación líquida de anticuerpo a isotónica de modo que la formulación de anticuerpo sea fisiológicamente compatible con las células del tejido corporal del sujeto. El "agente de tonicidad" puede contribuir a una mejora de la estabilidad de cualquiera de los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en la presente memoria. Una formulación "isotónica" es aquella que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tienen generalmente una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. El término "hipotónico" describe una formulación con una presión osmótica menor que la de la sangre humana. Correspondientemente, el término "hipertónico" se usa para describir una formulación con una presión osmótica superior a la de la sangre humana. La isotonicidad puede medirse usando un osmómetro de tipo presión de vapor o congelación con hielo, por ejemplo.

5 El agente de tonicidad usado para preparar las composiciones descritas en la presente memoria puede existir en diferentes formas. Cuando se hace referencia a un agente de tonicidad, se pretende que todas estas diferentes formas estén englobadas por el nombre del agente de tonicidad. Por ejemplo, el agente de tonicidad puede estar en forma enantiomérica (p.ej., enantiómero L o D) o racémica; isómeros tales como alfa o beta, incluyendo alfa,alfa o beta,beta o alfa,beta o beta,alfa; una forma de ácido libre o base libre; una forma hidratada (p.ej., monohidratada) o una forma anhidra.

10 El agente de tonicidad puede ser un sacárido. Como se usa en la presente memoria, el término "sacárido" hace referencia a una clase de moléculas que son derivados de alcoholes polihidroxílicos. Se hace referencia comúnmente a los sacáridos como carbohidratos y pueden contener diferentes cantidades de unidades de azúcar (sacárido), p.ej., monosacáridos, disacáridos y polisacáridos. Los sacáridos que son adecuados para uso como agente de tonicidad en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, sacáridos seleccionados del grupo consistente en fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, lactosa, maltosa, sacarosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrinas, almidón soluble, hidroxietilalmidón, glucanos hidrosolubles y mezclas de los mismos.

15 El agente de tonicidad puede ser un poliol. Como se usa en la presente memoria, el término "poliol" hace referencia a un excipiente con múltiples grupos hidroxilo e incluye azúcares (azúcares reductores y no reductores), alcoholes de azúcar y ácidos de azúcar. El poliol puede tener un peso molecular que es menor de aproximadamente 600 kDa (p.ej., en el intervalo de aproximadamente 120 a aproximadamente 400 kDa). Es un "azúcar reductor" aquel que contiene un grupo hemiacetal que puede reducir iones metálicos o reaccionar covalentemente con lisina u otros grupos amino de proteínas, y es un "azúcar no reductor" aquel que no tiene estas propiedades de azúcar reductor. 20 Los polioles que son adecuados para uso como agente de tonicidad como se describen en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, polioles seleccionados del grupo consistente en manitol, trehalosa, sorbitol, eritritol, isomaltitol, lactitol, maltitol, xilitol, glicerol, lactitol, propilenglicol, polietilenglicol, inositol y mezclas de los mismos. El agente de tonicidad puede ser un azúcar no reductor seleccionado del grupo consistente en trehalosa, sacarosa y mezclas de los mismos.

25 El agente de tonicidad puede ser manitol. El agente de tonicidad puede ser D-manitol. El agente de tonicidad puede ser trehalosa. El agente de tonicidad puede ser  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada. El agente de tonicidad puede ser sacarosa.

30 La concentración del agente de tonicidad en la composición farmacéutica líquida puede oscilar de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 400 mM, de 1 mM a aproximadamente 300 mM o de 200 mM a aproximadamente 275 mM. El agente de tonicidad puede ser manitol y puede estar presente en la composición farmacéutica líquida a una concentración de aproximadamente 247 mM. El agente de tonicidad puede ser trehalosa y puede estar presente en la composición farmacéutica líquida a una concentración de aproximadamente 222 mM. El agente de tonicidad puede ser trehalosa y puede estar presente en la composición farmacéutica líquida a una concentración de aproximadamente 238 mM. El agente de tonicidad puede ser sacarosa y puede estar presente en la composición farmacéutica líquida a una concentración de aproximadamente 263 mM. 35

40 La concentración del agente de tonicidad en la composición farmacéutica líquida puede oscilar de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml o de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. El agente de tonicidad puede ser manitol y puede estar presente en la composición farmacéutica líquida a una concentración de aproximadamente 45 mg/ml. El agente de tonicidad puede ser trehalosa y está presente en la composición farmacéutica líquida a una concentración de aproximadamente 84 mg/ml. El agente de tonicidad puede ser trehalosa y puede estar presente en la formulación farmacéutica líquida a una concentración de aproximadamente 90 mg/ml. El agente de tonicidad puede ser sacarosa y puede estar presente en la composición farmacéutica líquida a una concentración de aproximadamente 90 mg/ml.

45 El agente de tonicidad puede ser una sal tal como cloruro de sodio. Cuando el agente de tonicidad es una sal, la concentración de la sal en la composición farmacéutica líquida puede oscilar de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. El agente de tonicidad puede ser cloruro de sodio y la concentración de cloruro de sodio en la composición farmacéutica líquida puede ser de aproximadamente 8,18 mg/ml.

50 Se pretende también que se describan en la presente memoria los intervalos intermedios de las concentraciones de agente de tonicidad anteriormente enumeradas. Por ejemplo, se pretende incluir los intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores anteriormente enunciados como límites superior y/o inferior.

Se pretende también que se describan en la presente memoria los intervalos intermedios de las concentraciones de agente de tonicidad anteriormente enunciadas. Por ejemplo, se pretende incluir los intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores anteriormente enunciados como límites superior y/o inferior.

55 Como se indica anteriormente, las composiciones descritas en la presente memoria opcionalmente pueden comprender adicionalmente un tensioactivo farmacéuticamente aceptable además de un agente quelante. Como se usa en la presente memoria, el término "tensioactivo" hace referencia a un excipiente que puede alterar la tensión superficial de una formulación líquida de anticuerpo. El tensioactivo puede reducir la tensión superficial de una

- 5 formulación líquida de anticuerpo. El “tensioactivo” puede contribuir a una mejora de la estabilidad de cualquiera de los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en la presente memoria. Por ejemplo, el tensioactivo puede reducir la agregación del anticuerpo formulado y/o minimizar la formación de partículas en la formulación y/o reducir la adsorción. El tensioactivo puede mejorar también la estabilidad del anticuerpo durante y después de un ciclo de congelación/descongelación.
- Los tensioactivos adecuados incluyen tensioactivos de polisorbato, poloxámeros (p.ej., poloxámero 18 y 407), tensioactivos Triton tales como Triton X-100®, tensioactivos de polisorbato tales como Tween 20® y Tween 80®, dodecilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio, octilglicósido de sodio, laurilsulfobetaina, miristilsulfobetaina, linoleilsulfobetaina, estearilsulfobetaina, laurilsarcosina, miristilsarcosina, linoleilsarcosina, estearilsarcosina, linoleilbetaína, miristilbetaína, cetilbetaína, lauroamidopropilbetaína, cocamidopropilbetaína, linoleamidopropilbetaína, miristamidopropilbetaína, palmidopropilbetaína, isoestearamidopropilbetaína, miristamidopropildimetilamina, palmidopropildimetilamina, isoestearamidopropildimetilamina, metilcooiltaurato de sodio, metiloleiltaurato de disodio, cloruro de dihidroxipropil-PEG 5-linoleamónio, polietilenglicol, polipropilenglicol y mezclas de los mismos.
- 15 El tensioactivo puede ser un tensioactivo de polisorbato que comprende al menos un excipiente que se selecciona del grupo consistente en polisorbato 20, polisorbato 21, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 61, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 81, polisorbato 85 y mezclas de los mismos. La composición farmacéutica líquida puede comprender polisorbato 80.
- La concentración del tensioactivo, cuando está presente en la composición, oscila generalmente de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 5,0 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml o de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 0,7 mg/ml. El tensioactivo puede estar presente en una cantidad que es de aproximadamente 0,2 mg/ml. El tensioactivo puede estar presente en una cantidad que es de aproximadamente 0,5 mg/ml. La composición farmacéutica líquida puede contener aproximadamente 0,2 mg/ml de polisorbato 80. La composición farmacéutica líquida puede contener aproximadamente 0,4 mg/ml de polisorbato 80. La composición farmacéutica líquida puede contener aproximadamente 0,5 mg/ml de polisorbato 80.
- 25 Se pretende también que se describan en la presente memoria los intervalos intermedios de las concentraciones de tensioactivo anteriormente enunciadas. Por ejemplo, se pretende incluir los intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores anteriormente enunciados como límites superior y/o inferior.
- 30 Las composiciones descritas en la presente memoria opcionalmente pueden comprender adicionalmente un antioxidante farmacéuticamente aceptable además de un agente quelante. Los antioxidantes adecuados incluyen, pero sin limitación, metionina, tiosulfato de sodio, catalasa y platino. Por ejemplo, la composición farmacéutica líquida puede contener metionina a una concentración que oscila de 1 mM a aproximadamente 100 mM, y en particular es de aproximadamente 27 mM.
- 35 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y que comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano, y un agente quelante.
- 40 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y que comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano, y un agente quelante.
- 45 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano, y un agente quelante.
- Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende un anticuerpo monoclonal anti-CTLA, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano, y un agente quelante.
- 50 Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición contiene una concentración de anticuerpo que es de al menos aproximadamente 10 mg/ml, al menos aproximadamente 15 mg/ml, al menos aproximadamente 20 mg/ml o al menos aproximadamente 25 mg/ml.
- 55 Se describe también en la presente memoria una composición farmacéutica líquida que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia

aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición contiene una concentración de anticuerpo que oscila de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml.

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición contiene una concentración de anticuerpo que oscila de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml.

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición contiene una concentración de anticuerpo que oscila de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml.

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición contiene una concentración de anticuerpo que oscila de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml.

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición contiene una concentración de anticuerpo que oscila de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml.

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición contiene una concentración de anticuerpo que oscila de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml.

Se describe también en la presente memoria una composición que comprende al menos un anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 2, y comprende adicionalmente una secuencia aminoacídica que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el anticuerpo se une a CTLA-4 humano; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición contiene una concentración de anticuerpo que es de aproximadamente 20 mg/ml.

La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab y de aproximadamente 0,3  $\mu$ M a aproximadamente 50 mM de agente quelante.

La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab y de aproximadamente 3  $\mu$ M a aproximadamente 5,0 mM de agente quelante.

La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab y aproximadamente 0,27 mM de agente quelante.

La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab y de aproximadamente 0,3  $\mu$ M a aproximadamente 50 mM de EDTA.

La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab y de aproximadamente 3  $\mu$ M a aproximadamente 10,0 mM de EDTA.

- La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab y de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1,0 mM de EDTA.
- 5 La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab y aproximadamente 0,27 mM de EDTA.
- La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab y de aproximadamente 3  $\mu$ M a aproximadamente 5,0 mM de DTPA.
- 10 La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab y de aproximadamente 3  $\mu$ M a aproximadamente 5,0 mM de deferoxamina.
- La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab y de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM de histidina.
- 15 La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab, de aproximadamente 3  $\mu$ M a aproximadamente 5,0 mM de agente quelante y de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM de histidina.
- La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab, de aproximadamente 3  $\mu$ M a aproximadamente 5,0 mM de agente quelante y de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM de trehalosa.
- 20 La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab, de aproximadamente 3  $\mu$ M a aproximadamente 5,0 mM de agente quelante, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM de trehalosa y de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM de histidina.
- 25 La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab, de aproximadamente 3  $\mu$ M a aproximadamente 5,0 mM de agente quelante, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM de trehalosa, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM de histidina y de aproximadamente 0,005 mM a aproximadamente 10 mM de polisorbato 80.
- 30 La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab, de aproximadamente 3  $\mu$ M a aproximadamente 5,0 mM de EDTA, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM de agente de tonicidad, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM de tampón y de aproximadamente 0,005 mM a aproximadamente 10 mM de tensioactivo.
- 35 La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab, de aproximadamente 3  $\mu$ M a aproximadamente 5,0 mM de EDTA, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM de agente de tonicidad, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM de histidina y de aproximadamente 0,005 mM a aproximadamente 10 mM de tensioactivo.
- 40 La composición farmacéutica líquida puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab, de aproximadamente 3  $\mu$ M a aproximadamente 5,0 mM de EDTA, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM de trehalosa, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM de histidina y de aproximadamente 0,005 mM a aproximadamente 10 mM de tensioactivo.
- 45 Las composiciones líquidas de anticuerpo anti-CTLA-4 pueden comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM de histidina, de aproximadamente 0,005 mM a aproximadamente 10 mM de polisorbato 80, de aproximadamente 3  $\mu$ M a aproximadamente 5,0 mM de EDTA y de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM de trehalosa.
- 50 Las composiciones líquidas de anticuerpo anti-CTLA-4 pueden comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ticilimumab, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de histidina, de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1,0 mM de polisorbato 80, de aproximadamente 3  $\mu$ M a aproximadamente 5,0 mM de EDTA y de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM de trehalosa.



quelante oscila de aproximadamente 0,003 mM a aproximadamente 50 mM y la concentración molar de histidina es de aproximadamente 20 mM; y en la que la relación molar de anticuerpo a agente quelante oscila de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 o es de aproximadamente 0,5.

#### 5 **Procedimientos de producción de anticuerpos anti-CTLA-4 y líneas celulares productoras de anticuerpo:**

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden prepararse mediante la utilización de un ratón transgénico que tiene una porción sustancial del genoma productor de anticuerpo humano insertado, pero que se vuelve deficiente de producción de anticuerpos endógenos de murino. Dichos ratones son capaces entonces de producir moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos humanos y son deficientes de producción de moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos de murino. Las tecnologías utilizadas para conseguir los mismos se discuten a continuación.

Es posible producir animales transgénicos (p.ej., ratones) que sean capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Sin embargo, en particular, se da a conocer un ejemplo de realización de producción transgénica de ratones y anticuerpos a partir de los mismos en la patente de EE.UU. número 6.682.736 de Hanson, *et al.* Mediante el uso de dicha tecnología, pueden prepararse anticuerpos que se unen a CTLA-4 e hibridomas productores de dichos anticuerpos.

Los anticuerpos humanos evitan los problemas potenciales asociados a anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes de murino o rata. La presencia de dichas proteínas derivadas de murino o rata puede conducir a la rápida eliminación de los anticuerpos o puede conducir a la generación de una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo por un sujeto que reciba la administración de dichos anticuerpos.

Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo ( $J_H$ ) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos tras exposición al antígeno (p.ej., CTLA-4). Véanse, p.ej., Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993) y Duchosal *et al.*, *Nature* 355: 258 (1992). Los anticuerpos humanos pueden derivar también de colecciones de exhibición en fago (Hoogenboom *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991); Vaughan *et al.*, *Nature Biotech.* 14: 309 (1996)).

Los anticuerpos anti-CTLA-4 humanos pueden producirse inmunizando un animal transgénico no humano, p.ej., ratones XENOMOUSE™, cuyo genoma comprende genes de inmunoglobulina humana, de modo que el ratón recombinante produzca anticuerpos humanos. Los ratones XENOMOUSE™ son cepas de ratón genomanipuladas que comprenden fragmentos grandes de loci de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina humana y son deficientes de producción de anticuerpos de ratón. Los ratones XENOMOUSE™ producen un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos totalmente humanos y generan anticuerpos humanos específicos de antígeno. Los ratones XENOMOUSE™ pueden contener aproximadamente un 80 % del repertorio del gen V de anticuerpo humano mediante la introducción de fragmentos de cromosoma artificial de levadura (YAC) con configuración de línea germinal del tamaño de megabases de los loci de cadena pesada y loci de cadena ligera kappa humanas. Los ratones XENOMOUSE™ pueden contener adicionalmente aproximadamente todos los locus de cadena ligera lambda. Véanse, p.ej., Green *et al.*, *Nature Genetics* 7: 13-21 (1994) y las patentes de EE.UU. 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598, 6.130.364, 6.162.963 y 6.150.584. Véanse también los documentos WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 10 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560 y WO 00/037504.

El animal no humano que comprende genes de inmunoglobulina humana puede ser animales que tienen un "minilocus" de inmunoglobulina humana. En el enfoque de minilocus, se imita un locus de Ig exógena mediante la inclusión de genes individuales del locus de Ig. Por tanto, se conforman uno o más genes  $V_H$ , uno o más genes  $D_H$ , uno o más genes  $J_H$ , un dominio constante  $\mu$  y un segundo dominio constante (preferiblemente un dominio constante gamma) en un constructo para inserción en un animal. Este enfoque se describe, entre otras, en las patentes de EE.UU. nº 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215 y 5.643.763.

Por lo tanto, los anticuerpos humanos pueden producirse inmunizando un animal no humano que comprende en su genoma algunos o todos los loci de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina humana con un antígeno CTLA-4.

El antígeno CTLA-4 puede ser CTLA-4 aislado y/o purificado. El antígeno CTLA-4 puede ser CTLA-4 humano. El antígeno CTLA-4 es un fragmento de CTLA-4. El fragmento de CTLA-4 puede comprender al menos un epítipo de CTLA-4. El antígeno de CTLA-4 puede ser una célula que expresa o sobreexpresa CTLA-4 o un fragmento

inmunogénico del mismo sobre su superficie. El antígeno CTLA-4 puede ser una proteína de fusión de CTLA-4. El CTLA-4 puede purificarse a partir de fuentes naturales usando técnicas conocidas.

El animal no humano puede ser un animal XENOMOUSE™ (Abgenix Inc., Fremont, CA). Otro animal no humano que puede usarse es un ratón transgénico producido por Medarex (Medarex, Inc., Princeton, NJ).

5 La inmunización de animales puede ser mediante cualquier procedimiento conocido en la materia. Véase, p.ej., Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Los procedimientos para inmunizar animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, bovinos y caballos son bien conocidos en la materia. Véanse, p.ej., Harlow y Lane, *supra*, y la patente de EE.UU. 5.994.619. El antígeno CTLA-4 puede administrarse con un coadyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Los coadyuvantes ejemplares  
10 incluyen coadyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (dipéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Dichos coadyuvantes pueden proteger al polipéptido de la dispersión rápida al captarlo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al hospedador a secretar factores que sean quimiotácticos de macrófagos y otros componentes del sistema inmunitario. Preferiblemente, si se administra un polipéptido, el programa de inmunización puede implicar dos o más administraciones del polipéptido, separadas  
15 varias semanas.

Después de la inmunización de un animal con un antígeno de CTLA-4, pueden obtenerse anticuerpos y/o células productoras de anticuerpo del animal. Puede obtenerse del animal suero que contiene anticuerpo anti-CTLA-4. extrayendo sangre o sacrificando el animal. El suero puede usarse según se obtiene del animal, puede obtenerse la fracción de inmunoglobulina del suero o pueden purificarse los anticuerpos anti-CTLA-4 del suero.

20 Pueden prepararse líneas celulares inmortalizadas productoras de anticuerpo a partir de células aisladas del animal inmunizado. Después de la inmunización, se sacrifica el animal y se inmortalizan las células de nódulo linfático y/o linfocitos B esplénicos. Los procedimientos de inmortalización de células incluyen, pero sin limitación, transfectarlas con oncogenes, infectarlas con un virus oncogénico, cultivarlas en condiciones de selección de células inmortalizadas, someterlas a compuestos carcinogénicos o mutagénicos, fusionarlas con una célula inmortalizada,  
25 p.ej. una célula de mieloma, e inactivar un gen supresor tumoral. Véase, p.ej., Harlow y Lane, *supra*. El animal inmunizado puede ser un animal no humano que expresa genes de inmunoglobulina humana, y los linfocitos B esplénicos se fusionan con una línea celular de mieloma de la misma especie que el animal no humano. El animal inmunizado puede ser un animal XENOMOUSE™ y la línea celular de mieloma puede ser un mieloma de ratón no secretor. La línea celular de mieloma puede ser P3-X63-AG8-653. Si se usa la fusión con células de mieloma, las células de mieloma preferiblemente no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Se criban las células inmortalizadas usando CTLA-4, una porción del mismo o una célula que expresa CTLA-4. Se efectúa el cribado inicial usando un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) o un radioinmunoensayo. Se proporciona un ejemplo de cribado por ELISA en el documento WO 00/37504.

35 Se seleccionan células productoras de anticuerpo anti-CTLA-4, p.ej. hibridomas, se clonan y se criban adicionalmente las características deseables, incluyendo crecimiento robusto, alta producción de anticuerpos y características de anticuerpo deseables, como se discute adicionalmente a continuación. Los hibridomas pueden expandirse *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de sistema inmunitario, p.ej. ratones atímicos, o en cultivo celular *in vitro*. Los procedimientos de selección, clonación y expansión de hibridomas son bien conocidos por los especialistas en la materia.

40 Como se apreciará, los anticuerpos de acuerdo con la divulgación pueden expresarse recombinantemente en líneas celulares distintas de líneas celulares de hibridoma. Pueden usarse secuencias de ácido nucleico que codifican los ADNc o clones genómicos de los anticuerpos particulares para transformación de células hospedadoras de mamífero o no de mamífero.

45 Se describen también en la presente memoria moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-CTLA-4. Las diferentes moléculas de ácido nucleico pueden codificar una cadena pesada y una cadena ligera de una inmunoglobulina anti-CTLA-4. La misma molécula de ácido nucleico puede codificar una cadena pesada y una cadena ligera de una inmunoglobulina anti-CTLA-4. El ácido nucleico puede codificar un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente memoria.

50 Puede aislarse una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada o ligera completa de un anticuerpo anti-CTLA-4 o porciones de la misma a partir de cualquier fuente que produzca dicho anticuerpo. Las moléculas de ácido nucleico pueden aislarse de un linfocito B aislado de un animal inmunizado con anti-CTLA-4 o de una célula inmortalizada derivada de dicho linfocito B que expresa un anticuerpo anti-CTLA-4. Los procedimientos de aislamiento de ARNm que codifica un anticuerpo son bien conocidos en la materia. Véase, p.ej., Sambrook, *et al.*, "Molecular Cloning" 3ª Ed. vol.3 (1989). El ARNm puede usarse para producir ADNc para uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la clonación de ADNc de genes de anticuerpo. La molécula de ácido nucleico  
55 puede aislarse de un hibridoma que tiene como uno de sus copartícipes de fusión una célula productora de inmunoglobulina humana de un transgénico no humano. La célula productora de inmunoglobulina humana puede aislarse de un animal XENOMOUSE™. La célula productora de inmunoglobulina humana puede ser de un animal transgénico no humano no ratón, como se describe anteriormente. El ácido nucleico puede aislarse de un animal no

transgénico no humano. Pueden usarse moléculas de ácido nucleico aisladas de un animal no humano, p.ej., para anticuerpos humanizados

5 Un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente memoria puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica un dominio  $V_H$  descrito en la presente memoria unido en fase con una secuencia nucleotídica que codifica un dominio constante de cadena pesada de cualquier fuente. De forma similar, una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente memoria puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica un dominio  $V_L$  descrito en la presente memoria unido en fase con una secuencia nucleotídica que codifica un dominio constante de cadena ligera de cualquier fuente.

10 También se describe en la presente memoria que moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio variable de las cadenas pesada ( $V_H$ ) y ligera ( $V_L$ ) pueden "convertirse" en genes de anticuerpo completo. Las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios  $V_H$  o  $V_L$  pueden convertirse en genes de anticuerpo completo mediante inserción en un vector de expresión que ya codifica los dominios constante de cadena pesada ( $C_H$ ) o constante de cadena ligera ( $C_L$ ), respectivamente, de tal modo que el segmento de  $V_H$  esté enlazado operativamente con el segmento o segmentos de  $C_H$  en el vector, y el segmento de  $V_L$  esté enlazado operativamente con el segmento de  $C_L$  en el vector. Las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios  $V_H$  y/o  $V_L$  pueden convertirse en genes de anticuerpo completo enlazando, p.ej. ligando, una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio  $V_H$  y/o  $V_L$  con una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio  $C_H$  y/o  $C_L$  usando técnicas de biología molecular estándares. Las secuencias de ácido nucleico de los genes de dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana son conocidas en la materia. Véase, p.ej., Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological interest", 5ª Ed., NIH Publ. Nº. 91-3242, 1991. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y/o ligera completas pueden expresarse entonces a partir de una célula en que se han introducido y aislarse el anticuerpo anti-CTLA-4.

25 Se describen también en la presente memoria vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada de un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente memoria o una porción de unión a antígeno del mismo. Se describen también en la presente memoria vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera de dichos anticuerpos o una porción de unión a antígeno de los mismos. Se describen también en la presente memoria vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpo y sondas de los mismos

30 Los anticuerpos anti-CTLA-4, o porciones de antígeno de los mismos, descritos en la presente memoria pueden expresarse insertando ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o completas, obtenidas como se describe anteriormente, en vectores de expresión de tal modo que los genes estén enlazados operativamente con las secuencias de control de la expresión necesarias, tales como secuencias de control transcripcional y traduccional. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus de planta tales como virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco, cósmidos, YAC, episomas derivados de EBV y similares. Se liga el gen de anticuerpo en un vector de tal modo que las secuencias de control transcripcional y traduccional en el vector sirvan para su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. Se eligen el vector de expresión y secuencias de control de la expresión para ser compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. Pueden insertarse el gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo en vectores separados. Ambos genes pueden insertarse en el mismo vector de expresión. Se insertan los genes de anticuerpo en el vector de expresión mediante procedimientos estándares (p.ej. ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen de anticuerpo y vector, o ligamiento de extremos romos si no están presentes sitios de restricción).

45 Es un vector conveniente aquel que codifica una secuencia de inmunoglobulina  $C_H$  o  $C_L$  humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados genomanipulados de modo que pueda insertarse y expresarse fácilmente cualquier secuencia de  $V_H$  o  $V_L$ , como se describe anteriormente. En dichos vectores, aparece habitualmente corte y empalme entre el sitio donante de corte y empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de corte y empalme precedente al dominio C humano, y también en las regiones de corte y empalme que aparecen en los exones de  $C_H$  humano. Aparecen poliadenilación y terminación de la transcripción en los sitios cromosómicos nativos en dirección 3' de las regiones de codificación. El vector de expresión recombinante puede codificar también un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula hospedadora. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de tal modo que el péptido señal se enlace en fase con el extremo amino de la cadena de inmunoglobulina. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (concretamente, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

55 Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante descritos en la presente memoria portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula hospedadora. Se apreciará por los especialistas en la materia que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora para transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para expresión de células hospedadoras de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de retrovirus

- (tales como LTR retrovíricas), citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador de CMV), virus de simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (p.ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), promotores de polioma y de mamífero fuertes tales como promotores de inmunoglobulina y actina nativos. Para una descripción adicional de los elementos reguladores víricos y las secuencias de los mismos véanse, p.ej., patente de EE.UU. n° 5.168.062, patente de EE.UU. n° 4.510.245 y patente de EE.UU. n° 4.968.615. Los procedimientos para expresar anticuerpos en plantas incluyendo una descripción de promotores y vectores, así como la transformación de plantas, son conocidos en la materia. Véase, p.ej., la patente de EE.UU. n° 6.517.529. Son también bien conocidos en la materia procedimientos de expresión de polipéptidos en células bacterianas o células fúngicas, p.ej., células de levadura.
- Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante descritos en la presente memoria pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (p.ej. orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en que se ha introducido el vector (véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. n° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, el gen marcador seleccionable confiere típicamente resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en que se ha introducido en vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células hospedadoras de DHFR con selección/amplificación por metotrexato), el gen de resistencia a neomicina (para selección por G418) y el gen de glutamina sintetasa.
- Pueden usarse moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-CTLA-4 y vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico para la transformación de una célula hospedadora de mamífero, planta, bacteria o levadura adecuada. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden producirse transgénicamente mediante la generación de un mamífero o planta que sea transgénico de las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en forma recuperable a partir del mismo.
- La transformación puede ser mediante cualquier procedimiento conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedadora incluyendo, por ejemplo, empaquetamiento del polinucleótido en un virus (o en un vector vírico) y transducción de una célula hospedadora con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la materia, como se ejemplifican en las patentes de EE.UU. n° 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. El procedimiento de transformación usado depende del hospedador para transformar. Los procedimientos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la materia e incluyen, pero sin limitación, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, bombardeo de partículas, encapsulación del polinucleótido o polinucleótidos en liposomas, conjugados peptídicos, dendrímeros y microinyección directa del ADN en núcleos.
- Las líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadores para expresión son bien conocidas en la materia e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC) incluyendo, pero sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p.ej., Hep G2) y una serie de otras líneas celulares. Pueden usarse células no de mamífero incluyendo, pero sin limitación, de bacterias, levadura, insecto y planta, para expresar anticuerpos recombinantes. Puede preferirse la mutagénesis dirigida a sitio del dominio CH2 de anticuerpo para eliminar la glicosilación para evitar los cambios en la inmunogenicidad, farmacocinética y/o funciones efectoras resultantes de la glicosilación no humana. Los procedimientos de expresión se seleccionan determinando cuál sistema genera los mayores niveles de expresión y produce anticuerpos con propiedades de unión a CTLA-4 constitutiva.
- Adicionalmente, la expresión de los anticuerpos descritos en la presente memoria (u otros restos de los mismos) a partir de líneas celulares de producción puede potenciarse usando una serie de técnicas conocidas. Por ejemplo, los sistemas de expresión génica de glutamina sintetasa y DHFR son enfoques comunes para potenciar la expresión en ciertas condiciones. Los clones celulares de alta expresión pueden identificarse usando técnicas convencionales, tales como clonación por dilución limitante y la tecnología Microdrop. El sistema de glutamina sintetasa se discute totalmente o en parte con respecto a las patentes europeas n° 0.216.846, 0.256.055 y 0.323.997 y la solicitud de patente europea n° 89303964.4.
- Con relación a la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos pueden producirse también en, y recuperarse de, leche de cabras, vacas u otros mamíferos. Véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. n° 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172 y 5.741.957.
- Los anticuerpos anti-CTLA-4 expresados en líneas celulares como se describen anteriormente pueden purificarse y/o aislarse a partir del material celular aislado. Los anticuerpos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. La purificación se efectúa para eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, p.ej., otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándares que incluyen tratamiento alcalino/SDS, cromatografía en columna y otros bien conocidos en la materia. Véase Ausubel, F., *et al.*, ed. "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987).

En la presente memoria, es posible que los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en la presente memoria expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan diferentes patrones de glicosilación entre sí. Sin embargo, todos los anticuerpos anti-CTLA-4 codificados por los ácidos nucleicos y aminoácidos proporcionados en la presente memoria se consideran descritos en la presente memoria, independientemente de su patrón de glicosilación o modificación o delección del mismo. Por tanto, con los fines de la presente divulgación, los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden estar glicosilados o no glicosilados. Cuando los anticuerpos anti-CTLA-4 están glicosilados, pueden tener cualquier patrón de glicosilación posible. Además, cada cadena pesada en un anticuerpo puede tener el mismo patrón de glicosilación o las dos cadenas pesadas pueden tener diferentes patrones de glicosilación. Se describe también en la presente memoria la mutagénesis dirigida a sitio del dominio CH2 de anticuerpo para eliminar la glicosilación, para evitar cambios en la inmunogenicidad, farmacocinética y/o funciones efectoras resultantes de la glicosilación no humana.

Como se usa en la presente memoria, el término "glicosilación" significa el patrón de unidades de carbohidrato que están unidas covalentemente con un anticuerpo. Cuando se dice que los anticuerpos anti-CTLA-4 de la presente memoria tienen un patrón de glicosilación particular, se entiende que la mayoría de los anticuerpos anti-CTLA-4 referenciados tienen ese patrón de glicosilación particular. En otros aspectos, cuando se dice que los anticuerpos anti-CTLA-4 de la presente memoria tienen un patrón de glicosilación particular, se entiende que un número mayor o igual al 50, 75, 90, 95, 99 o 100 % de los anticuerpos anti-CTLA-4 referenciados tienen ese patrón de glicosilación particular.

Los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en la presente memoria engloban también variantes de glicosilación de los mismos (p.ej., mediante la inserción de un sitio de glicosilación o la delección de cualquier sitio de glicosilación por delección, inserción o sustitución de los residuos aminoácidos adecuados).

La glicosilación de polipéptidos está típicamente *N*-enlazada u *O*-enlazada. La glicosilación de polipéptidos de anticuerpo está típicamente *N*-enlazada y forma una estructura biantenada. *N*-enlazado hace referencia a la conexión del resto carbohidrato con la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la conexión enzimática del resto carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un anticuerpo crea un sitio de glicosilación potencial.

Las tres distintas estructuras de glicanos biantenados se designan "G0", "G1" y "G2" y tienen 0, 1 o 2, respectivamente, residuos de galactosa terminales en el extremo no reductor del glicano. Véase Jefferis *et al.*, *Biochem. J.*, 268, 529-537 (1990). En algunos casos, la estructura de glicano puede tener también un residuo de fucosa enlazado con una *N*-acetilglucosamina, que está unida covalentemente con el aminoácido asparagina (p.ej., posición 297) encontrado en el anticuerpo. Cuando está presente fucosa (F), se cambia la nomenclatura de glicano biantenado a "G0F", "G1F" o "G2F", dependiendo del número de residuos de galactosa terminales. Véase Teillaud, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 5 (supl.1): S15-S27 (2005). Además, cuando el anticuerpo contiene ambas cadenas pesadas, se repite la nomenclatura de glicano para cada una de las dos cadenas pesadas. La glicofoma "G0F,G0F" es una especie en que ambas cadenas pesadas tienen el glicano G0 conectado y cada glicano G0 tiene un residuo de fucosa (F) enlazado con una *N*-acetilglucosamina. La glicofoma "G0F,G1F" es una especie en que una de las cadenas pesadas tiene el glicano G0 conectado y la otra cadena pesada tiene el glicano G1 conectado, teniendo cada glicano G0 y glicano G1 un residuo de fucosa (F) enlazado con una *N*-acetilglucosamina.

Los anticuerpos anti-CTLA-4 tienen un patrón de glicosilación que puede seleccionarse del grupo consistente en "G0F,G0F"; "G0F,G1F"; "G1F,G1F"; "G1F,G2F" y mezclas de los mismos. Los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden tener un patrón de glicosilación que es "G0F,G1F" para más del 50 % de los anticuerpos producidos. Los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden tener un patrón de glicosilación que es "G0F,G0F" para menos de un 50 % de los anticuerpos producidos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1 descrito en la presente memoria tiene un patrón de glicosilación "G0F,G0F" o "G0F,G1F". Pueden producirse anticuerpos anti-CTLA-4 (11.2.1) que tienen una mezcla de diferentes patrones de glicosilación. Por ejemplo, en una muestra de anticuerpos (11.2.1), puede haber una mezcla de anticuerpos (11.2.1) en que algunos tienen un patrón de glicosilación "G0F,G1F" y otros tienen un patrón de glicosilación "G0F,G0F" a una relación de aproximadamente 3:2, respectivamente.

#### **Vías de administración y dosificaciones:**

Las composiciones descritas en la presente memoria pueden estar en soluciones líquidas (p.ej., soluciones inyectables e infusibles). La forma preferida depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica pretendidos. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las usadas para inmunización pasiva de seres humanos. El modo de administración preferido es parenteral (p.ej., intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular e intraesternal) o mediante técnicas de infusión, en forma de suspensiones líquidas u oleaginosas inyectables estériles. Como se apreciará por el especialista en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. El anticuerpo puede administrarse por infusión o inyección intravenosa. El anticuerpo puede administrarse por inyección intramuscular o subcutánea. Las composiciones terapéuticas son típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento.

- La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión o liposoma. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el anticuerpo anti-CTLA-4 en la cantidad requerida a un diluyente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización (p.ej., esterilización por filtración). Generalmente, se preparan dispersiones incorporan el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. Dichas suspensiones pueden formularse según técnicas conocidas usando los agentes de dispersión o humectación y suspensión adecuados u otros agentes aceptables. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse, están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites estériles no volátiles como disolvente o medio de suspensión. Con este fin, puede emplearse cualquier aceite no volátil insípido, incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos n-3 poliinsaturados pueden encontrar uso en la preparación de inyectables.
- En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado a vacío y liofilización, que procura un polvo de ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo esterilizada por filtración anteriormente. Puede mantenerse la fluidez apropiada de la solución, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos.
- Puede causarse la absorción prolongada de composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo sales de monoestearato y gelatina, o formulando la composición en formas de absorción prolongada tales como de absorción lenta, liposomas, microesferas poliméricas, geles poliméricos e implantes.
- Otros procedimientos para la administración de los anticuerpos descritos en la presente memoria incluyen parches dérmicos que liberan las medicaciones directamente a la piel de un sujeto. Dichos parches pueden contener los anticuerpos descritos en la presente memoria en una solución líquida opcionalmente tamponada, disueltos y/o dispersados en un adhesivo o dispersados en un polímero
- Aún otros procedimientos para la administración de los anticuerpos descritos en la presente memoria incluyen gotas líquidas oftalmológicas para los ojos.
- El anticuerpo puede administrarse una vez, pero más preferiblemente se administra múltiples veces. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse de una vez al día a una vez cada seis meses o más. La administración puede ser por un programa tal como de tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses.
- El anticuerpo puede administrarse también de forma continua mediante una minibomba. El anticuerpo puede administrarse al sitio del tumor o parte del cuerpo inflamada, al tumor o parte del cuerpo inflamada o a un sitio distante del tumor o parte del cuerpo inflamada. El anticuerpo puede administrarse una vez, al menos dos veces o durante al menos un período de tiempo hasta tratar, paliar o curar la afección. El anticuerpo puede administrarse generalmente mientras el tumor esté presente a condición de que el anticuerpo cause que el tumor o cáncer detenga su crecimiento o disminuya su peso o volumen o hasta que se cure la parte del cuerpo inflamada. El anticuerpo se administraría típicamente como parte de una composición farmacéutica como se describe *supra*.
- Las composiciones descritas en la presente memoria pueden incluir una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz de un anticuerpo o porción de unión a antígeno descrito en la presente memoria. En la preparación de la formulación, puede determinarse la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CTLA-4 presente en la formulación, por ejemplo, teniendo en cuenta los volúmenes de dosis y modos de administración deseados, la naturaleza y gravedad de la afección para tratar y la edad y tamaño del sujeto.
- Los intervalos de dosis ejemplares no limitantes para administración de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria a un sujeto son de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg (expresadas en términos de miligramos (mg) de anticuerpo anti-CTLA-4 administrados por kilogramo (kg) de peso de sujeto), de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 5,0 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, o de aproximadamente 15 mg/kg. Con los fines descritos en la presente memoria, un sujeto humano promedio pesa aproximadamente 70 kg.
- Se pretende también que estén descritos en la presente memoria los intervalos intermedios de cualquiera de las dosificaciones citadas en la presente memoria, p.ej., aproximadamente 0,01 mg/kg-199 mg/kg. Por ejemplo, se pretende incluir intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores enumerados como límites superior y/o inferior.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse también para proporcionar la respuesta óptima deseada (p.ej., una respuesta terapéutica o profiláctica) administrando varias dosis divididas a un sujeto con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria por la facilidad de administración y uniformidad de la dosificación.

Forma de dosificación unitaria como se usa en la presente memoria hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos para tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Las especificaciones de las formas de dosificación unitaria descritas en la presente memoria están dictadas por y son directamente dependientes de (a) las características únicas del anticuerpo anti-CTLA-4 o porción y el efecto terapéutico o profiláctico particular para conseguir, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de la formulación de dicho anticuerpo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Las formulaciones líquidas descritas en la presente memoria pueden prepararse como formas de dosificación unitaria. Por ejemplo, una dosificación unitaria por vial puede contener de 1 a 1000 mililitros (ml) de diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CTLA-4. La dosificación unitaria por vial puede contener aproximadamente 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml o 100 ml de diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CTLA-4. Si es necesario, pueden ajustarse estas preparaciones a la concentración deseada añadiendo un diluyente estéril a cada vial. Las formulaciones líquidas descritas en la presente memoria pueden prepararse también como formas de dosificación unitaria en bolsas o envases estériles, que sean adecuados con respecto a una vía o catéter de administración intravenosa.

#### **Valoración de estabilidad:**

Se describen también en la presente memoria composiciones farmacéuticas líquidas estables que comprenden un anticuerpo anti-CTLA-4 como se describe en la presente memoria y un agente quelante farmacéuticamente aceptable. Una composición estable es deseable para mantener o resistir a cambios en, por ejemplo, la apariencia e integridad del producto (incluyendo degradación física o química que conduce potencialmente a una reducción de la actividad biológica). Se reseñan en la bibliografía diversas técnicas analíticas e indicadores de la medida de la estabilidad de proteínas y se revisan una serie de estas técnicas e indicadores en "Peptide and Protein Drug Delivery", 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). En general, las composiciones farmacéuticas líquidas descritas en la presente memoria exhiben una estabilidad mejorada cuando se someten a temperaturas de almacenamiento bajas durante un periodo de tiempo y/o cuando se someten a uno o más ciclos de congelación/descongelación.

La composición, cuando se almacena a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C durante al menos aproximadamente 12 meses, preferiblemente al menos aproximadamente 18 meses y más preferiblemente al menos aproximadamente 24 meses, puede ser más estable que una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante que se almacena en las mismas condiciones durante el mismo tiempo.

La composición, cuando se almacena a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C durante al menos aproximadamente 3 meses, preferiblemente al menos 6 meses y más preferiblemente al menos aproximadamente 12 meses, puede ser más estable que una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante que se almacena en las mismas condiciones durante el mismo tiempo.

La composición, cuando se almacena a una temperatura de aproximadamente 40 °C durante al menos aproximadamente 1 mes, preferiblemente al menos aproximadamente 2 meses y más preferiblemente al menos aproximadamente 3 meses, puede ser más estable que una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante que se almacena en las mismas condiciones durante el mismo tiempo.

Como se usa en la presente memoria, el término "un ciclo de congelación/descongelación" hace referencia a técnicas para usar una muestra líquida de anticuerpo después de almacenamiento en estado congelado, en el que la temperatura de la muestra se baja a una temperatura de 0 °C o menos para congelar la muestra líquida, y se somete entonces la muestra a una temperatura que restablecerá su estado líquido durante un periodo de tiempo suficiente para permitir el uso de la muestra, seguido de la vuelta a almacenamiento en estado congelado, preferiblemente a una temperatura de 0 °C o menos. Como se usa en la presente memoria, "almacenamiento en estado congelado" hace referencia a congelar y mantener una muestra anteriormente líquida de anticuerpo a una temperatura de 0 °C o menos, y preferiblemente de -20 °C o menos.

La composición, cuando se somete a al menos 1 ciclo de congelación/descongelación, preferiblemente al menos 2 ciclos de congelación/descongelación, más preferiblemente al menos 3 ciclos de congelación/descongelación, aún más preferiblemente al menos 4 ciclos de congelación/descongelación, aún más preferiblemente al menos 5 ciclos de congelación/descongelación y aún más preferiblemente al menos 6 ciclos de congelación/descongelación, puede ser más estable que una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante que se somete a las mismas condiciones de congelación/descongelación.

La composición puede satisfacer dos o más de las siguientes condiciones:

- 5 (a) la composición, cuando se almacena a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C durante al menos aproximadamente 12 meses, preferiblemente al menos aproximadamente 18 meses y más preferiblemente al menos aproximadamente 24 meses, es más estable que una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante que se somete a las mismas condiciones durante el mismo tiempo;
- (b) la composición, cuando se almacena a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C durante al menos aproximadamente 3 meses, preferiblemente al menos 6 meses y más preferiblemente al menos aproximadamente 12 meses, es más estable que una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante que se somete a las mismas condiciones durante el mismo tiempo;
- 10 (c) la composición, cuando se almacena a una temperatura de aproximadamente 40 °C durante al menos aproximadamente 1 mes, preferiblemente al menos aproximadamente 2 meses y más preferiblemente al menos aproximadamente 3 meses, es más estable que una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante que se somete a las mismas condiciones durante el mismo tiempo; o
- 15 (d) la composición, cuando se somete a al menos 1 ciclo de congelación/descongelación, preferiblemente al menos 2 ciclos de congelación/descongelación, más preferiblemente al menos 3 ciclos de congelación/descongelación, aún más preferiblemente al menos 4 ciclos de congelación/descongelación, aún más preferiblemente al menos 5 ciclos de congelación/descongelación y aún más preferiblemente al menos 6 ciclos de congelación/descongelación, es más estable que una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante que se somete a las mismas condiciones de congelación/descongelación.
- 20 La composición puede satisfacer tres o más de las condiciones discutidas inmediatamente antes.

Con los fines descritos en la presente memoria, pueden usarse la agregación de anticuerpos, fragmentación de anticuerpos y/o decoloración de la composición, por ejemplo, como indicadores de la estabilidad de la composición. En general, las composiciones farmacéuticas líquidas descritas en la presente memoria exhiben un menor nivel de al menos una de agregación de anticuerpos, fragmentación de anticuerpos y decoloración de la composición cuando se someten a una o más de las condiciones de almacenamiento o congelación/descongelación descritas anteriormente respecto a composiciones por lo demás idénticas que carecen del agente quelante que se someten a las mismas condiciones

25

La agregación de proteínas en una composición farmacéutica líquida puede medirse mediante diversos procedimientos conocidos en la materia. Dichos procedimientos incluyen cromatografía de filtración en gel para separar las proteínas basándose en su peso molecular. Un "gel" es una matriz de agua y un polímero, tal como agarosa o acrilamida polimerizada. Se describe también en la presente memoria el uso de la filtración en gel por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). Otros procedimientos reconocidos de medida de la agregación incluyen cromatografía de intercambio catiónico, que es la técnica cromatográfica líquida general de cromatografía de intercambio iónico que utiliza columnas aniónicas. Los cationes intercambiados en la presente memoria son de las moléculas proteicas. Puesto que los agregados proteicos multivalentes pueden tener algunos múltiplos de la carga neta de la proteína de unión a antígeno monocatenaria, los agregados pueden retenerse más fuertemente, y pueden separarse de las moléculas monocatenarias. Es un intercambiador catiónico preferido una columna de poli(ácido aspártico). Por tanto, puede distinguirse fácilmente una proteína monomérica de un agregado. Sin embargo, los especialistas en la materia se darán cuenta de que los ensayos de agregación descritos en la presente memoria no están limitados a ningún tipo particular de columna de cromatografía, siempre que sea capaz de separar las dos formas de moléculas proteicas.

30

35

40

La fragmentación proteica en una composición farmacéutica líquida puede medirse mediante diversos procedimientos conocidos en la materia. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, detección ultravioleta (p.ej. a 214 nanómetros), PAGE-SDS y/o desorción/ionización por láser asistida por matriz/tiempo de vuelo-espectrometría de masas (MALDI-TOF/EM). Puede evaluarse la fragmentación proteica resultante en una alteración de la carga (p.ej., que aparece como resultado de la desamidación), por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico o enfoque isoelectrónico (EIE).

45

La decoloración de la composición puede medirse generalmente por observación visual de la composición misma. Las presentes composiciones farmacéuticas líquidas que comprenden un agente quelante reducen generalmente la decoloración de la composición (p.ej., rosa o amarillo) y/o mantienen la claridad de la composición (p.ej., turbidez, opacidad y/o formación de partículas) respecto a composiciones por lo demás idénticas que no contienen el agente quelante. Con los fines descritos en la presente memoria, el término "decoloración" hace referencia tanto a cambios de color (p.ej., de transparente e incoloro a rosa o amarillo) como a cambios de claridad (p.ej., de transparente e incoloro a turbio, opaco y/o con partículas). La decoloración de la composición puede medirse generalmente usando técnicas adicionales tales como por detección ultravioleta a 214 nanómetros y/o por comparación visual frente a una escala de color patrón de las composiciones con y sin el agente quelante. Véase Ph. Eur 5.0, 2005 Monografía 2.2.2.

50

55

La agregación de anticuerpos puede determinarse después de someter la composición a al menos una de las siguientes condiciones:

- 5 (a) se almacena la composición a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C durante al menos aproximadamente 12 meses, preferiblemente al menos aproximadamente 18 meses y más preferiblemente al menos aproximadamente 24 meses;
- (b) se almacena la composición a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C durante al menos aproximadamente 3 meses, preferiblemente al menos 6 meses y más preferiblemente al menos aproximadamente 12 meses;
- 10 (c) se almacena la composición a una temperatura de aproximadamente 40 °C durante al menos aproximadamente 1 mes, preferiblemente al menos aproximadamente 2 meses y más preferiblemente al menos aproximadamente 3 meses; o
- 15 (d) se somete la composición a al menos 1 ciclo de congelación/descongelación, preferiblemente al menos 2 ciclos de congelación/descongelación, más preferiblemente al menos 3 ciclos de congelación/descongelación, aún más preferiblemente al menos 4 ciclos de congelación/descongelación, aún más preferiblemente al menos 5 ciclos de congelación/descongelación y aún más preferiblemente al menos 6 ciclos de congelación/descongelación. Se separan entonces por cromatografía los agregados de anticuerpos de la composición (p.ej., usando HPLC) y se determina la extensión de la agregación a partir del cromatograma resultante. Las composiciones farmacéuticas líquidas estables descritas en la presente memoria tienen típicamente un área de pico agregado en el cromatograma que es menor de aproximadamente un 6 %, menor de aproximadamente un 5 %, menor de aproximadamente un 4 %, menor de aproximadamente un 3 %, menor de aproximadamente un 2 % o menor de aproximadamente un 1,5 % del área total del pico en el cromatograma. En un ejemplo específico de esta técnica para medir la agregación, se almacena la composición durante 24 semanas a 40 °C y se realiza entonces la separación cromatográfica usando SE-HPLC con detección ultravioleta a 214 nanómetros. Se usó esta técnica para medir la agregación de anticuerpos en el Ejemplo 11 donde, por ejemplo, la formulación nº 37 (que contiene un agente quelante) exhibía un área de pico agregado en el cromatograma de aproximadamente un 1,1 %, mientras que la Formulación 26 (que carece de agente quelante) exhibía un área de pico agregado en el cromatograma de aproximadamente un 6,4 %.

En general, la diferencia entre el área de pico de cromatograma agregado para una composición farmacéutica líquida estable descrita en la presente memoria y el área de pico de cromatograma agregado para una composición por lo demás idéntica que carece de agente quelante que se somete a las mismas condiciones es de al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 3 %, al menos aproximadamente un 4 % o al menos aproximadamente un 4,5 %. Por ejemplo, esta diferencia entre la Formulación 37 (área de pico agregado en el cromatograma de aproximadamente 1,1 %) y la Formulación 26 (área de pico agregado en el cromatograma de aproximadamente 6,4 %) ensayada en el Ejemplo 11 como se discute anteriormente es de aproximadamente un 5,3 %.

35 La fragmentación de anticuerpos puede determinarse después de someter la composición a al menos una de las siguientes condiciones:

- (a) se almacena la composición a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C durante al menos aproximadamente 12 meses, preferiblemente al menos aproximadamente 18 meses y más preferiblemente al menos aproximadamente 24 meses;
- 40 (b) se almacena la composición a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C durante al menos aproximadamente 3 meses, preferiblemente al menos 6 meses y más preferiblemente al menos aproximadamente 12 meses;
- (c) se almacena la composición a una temperatura de aproximadamente 40 °C durante al menos aproximadamente 1 mes, preferiblemente al menos aproximadamente 2 meses y más preferiblemente al menos aproximadamente 3 meses; o
- 45 (d) se somete la composición a al menos 1 ciclo de congelación/descongelación, preferiblemente al menos 2 ciclos de congelación/descongelación, más preferiblemente al menos 3 ciclos de congelación/descongelación, aún más preferiblemente al menos 4 ciclos de congelación/descongelación, aún más preferiblemente al menos 5 ciclos de congelación/descongelación y aún más preferiblemente al menos 6 ciclos de congelación/descongelación. Se separan entonces por cromatografía los agregados de anticuerpo de la composición (p.ej., usando filtración en gel) y se determina la extensión de la agregación a partir del cromatograma resultante. Las composiciones farmacéuticas líquidas estables descritas en la presente memoria tienen típicamente un volumen de banda fragmentario en el cromatograma que es menor de aproximadamente un 9 %, menor de aproximadamente un 8 %, menor de aproximadamente un 7 %, menor de aproximadamente un 6 %, menor de aproximadamente un 5 % o menor de aproximadamente un 4,5 % del volumen de banda total en el cromatograma. En un ejemplo específico de esta técnica para medir la fragmentación, se almacena la composición durante 24 semanas a 40 °C y se somete entonces a cromatografía usando PAGE-SDS reducido (PAGE-SDSr) con los volúmenes de banda determinados por barrido con un densitómetro Molecular Dynamics Personal Densitometer PDQC-90 o un densitómetro Bio-Rad

GS800 Imaging Densitometer. Se usó esta técnica para medir la fragmentación de anticuerpos en el Ejemplo 11 donde, por ejemplo, la Formulación nº 37 (que contiene agente quelante) exhibía un volumen de banda fragmentario en el cromatograma de aproximadamente un 4,5 % mientras que la formulación 26 (que carece de agente quelante) exhibía un volumen de banda fragmentario en el cromatograma de aproximadamente un 10,1 %.

- 5 En general, la diferencia entre el volumen de banda fragmentario para una composición farmacéutica líquida estable descrita en la presente memoria y el volumen de banda fragmentario de una composición por lo demás idéntica que carece de agente quelante que se somete a las mismas condiciones es de al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 3 %, al menos aproximadamente un 4 % o al menos aproximadamente un 5 %. Por ejemplo, esta diferencia entre la Formulación 37 (volumen de banda fragmentario en el cromatograma de aproximadamente un 4,5 %) y la Formulación 26 (volumen de banda fragmentario en el cromatograma de aproximadamente un 10,1 %) ensayada en el Ejemplo 11 como se discute anteriormente es de aproximadamente un 5,6 %.

**Procedimientos de tratamiento:**

- 15 Cualquiera de los tipos de anticuerpos descritos en la presente memoria puede usarse terapéuticamente. El anticuerpo anti-CTLA-4 puede ser un anticuerpo humano. El CTLA-4 puede ser humano y el sujeto puede ser un sujeto humano. El anticuerpo anti-CTLA-4 puede ser un anticuerpo de IgG2 humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero que expresa una proteína CTLA-4 con la que el anticuerpo anti-CTLA-4 reacciona cruzadamente. El anticuerpo puede administrarse a un mamífero no humano que expresa CTLA-4 con la que el anticuerpo reacciona cruzadamente (concretamente un primate) con fines veterinarios, o como modelo animal de enfermedad humana. Dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos descritos en la presente memoria.

- 25 Se describe también en la presente memoria un procedimiento para el tratamiento de una afección neoplásica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica líquida que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, y un agente quelante solo o en combinación con otros excipientes elegidos de tampón, agente de tonicidad o tensioactivo, y mezclas de los mismos. El sujeto anteriormente mencionado puede ser aquel necesitado de prevención o tratamiento de una afección neoplásica.

- 30 Se describe también en la presente memoria un procedimiento para el tratamiento de una afección neoplásica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica líquida que comprende el anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab, y un excipiente farmacéuticamente aceptable que comprende un agente quelante solo o en combinación con otros excipientes elegidos de tampón, agente de tonicidad o tensioactivo, y mezclas de los mismos.

- 35 Ambos términos, “neoplasia” y “afección neoplásica”, hacen referencia a un “neoplasma” o tumor que puede ser benigno, premaligno, metastásico o maligno. Se describen también en la presente memoria neoplasias benignas, premalignas, metastásicas o malignas. Se describen también en la presente memoria tumores benignos, premalignos, metastásicos o malignos. Por tanto, todas las neoplasias o tumores benignos, premalignos, metastásicos o malignos están englobados en la presente memoria y puede hacerse referencia a ellos intercambiamente como neoplasias, neoplasmas o afecciones relacionadas con neoplasias. Los tumores son generalmente conocidos en la materia por ser una masa de neoplasia o células “neoplásicas”. Sin embargo, ha de entenderse que, incluso una célula neoplásica se considera, con los fines descritos en la presente memoria, que es un neoplasma o, como alternativa, neoplasia.

- 40 Las afecciones neoplásicas que pueden tratarse por un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente memoria pueden implicar cualquier tejido u órgano e incluyen, pero sin limitación, cánceres de hueso, cerebro, pulmón, escamoso, de vejiga, gástrico, pancreático, de mama, cabeza, cuello, hígado, renal, de ovario, próstata, colorrectal, esofágico, ginecológico (p.ej., cervicouterino y ovárico), de nasofaringe o tiroideo. Están también englobados por el término afecciones neoplásicas las metástasis óseas, melanomas, linfomas, leucemias y mielomas múltiples. En particular, las formulaciones de anticuerpo anti-CTLA-4 descritas en la presente memoria son útiles para tratar cánceres de mama, próstata, colon y pulmón.

- 50 Los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria pueden englobar la prevención y el tratamiento de las afecciones neoplásicas seleccionadas del grupo consistente en melanoma lentiginoso acral, queratosis actínicas, adenocarcinoma, carcinoma quístico adenoide, adenomas, poliposis adenomatosa familiar, pólipos familiares, pólipos de colon, pólipos, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, carcinoma adrenocortical, linfoma relacionado con SIDA, cáncer anal, tumores astrocíticos, carcinoma de la glándula de Bartolino, carcinoma basocelular, cáncer de conducto biliar, cáncer de vejiga, glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales, cáncer de mama, carcinomas de la glándula bronquial, carcinoma capilar, carcinoides, carcinoma, carcinoma de los tubos de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinosarcoma, hemangioma cavernoso, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebral, colangiocarcinoma, condrosarcoma, papiloma/carcinoma de plexo coroideo, carcinoma renal, cáncer de piel, cáncer de cerebro, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma de linfocitos T cutáneos, cistoadenoma, tumor del seno endodérmico, hiperplasia endométrica, sarcoma del estroma endométrico, adenocarcinoma endometriode, cáncer ependimario, epitelioide o esofágico, sarcoma de Ewing, tumor de células germinales extragonádicas, carcinoma fibrolamelar, hiperplasia nodular focal, cáncer de vesícula biliar, gastrinoma,

- tumores de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, glioblastoma, glioma, glucagonoma, hemangioblastomas, hemangioendotelio, hemangiomas, adenoma hepático, adenomatosis hepática, carcinoma hepatocelular, linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, glioma hipotalámico y de las vías ópticas, insulinoma, neoplasia intraepitelial, neoplasia escamosa interepitelial, melanoma intraocular, carcinoma escamoso invasivo, carcinoma de células grandes, carcinoma de células de islote, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer laríngeo, leiomiomas, melanomas de lentigo maligno, afecciones relacionadas con la leucemia, cáncer de labio y de cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, tumores mesoteliales malignos, tímoma maligno, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, carcinomatosis meningeal, carcinoma de células de Merkel, carcinoma mesotelial metastásico, carcinoma mucoepidermoide, mieloma múltiple/neoplasma de células plasmáticas, micosis fungoide, síndrome mielodisplásico, afecciones mieloproliferativas, cáncer de cavidad nasal y de seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, neoplasmas del sistema nervioso central (p.ej., linfoma primario del SNC, tumores del eje medular, gliomas del tronco encefálico o adenomas de pituitaria), linfoma no de Hodgkin, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma oligodendrogial, cáncer oral, cáncer bucofaríngeo, osteosarcoma, polipéptido pancreático, cáncer ovárico, tumor de células germinales ováricas, cáncer pancreático, adenocarcinoma seroso papilar, carcinoma de pinealocitos, tumores de pituitaria, plasmacitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, feocromocitoma, tumores neuroectodérmicos primitivos pineal y supratentorial, tumor de pituitaria, neoplasma de células plasmáticas, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, carcinomas de tejido blando, tumor secretor de somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma espinocelular, melanoma submesotelial de extensión superficial, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer tiroideo, carcinoma indiferenciado, cáncer de uretra, cáncer uterino, melanoma uveal, carcinoma verrugoso, cáncer vaginal, vipoma, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström, carcinoma bien diferenciado y tumor de Wilm.
- El anticuerpo anti-CTLA-4 puede administrarse a un sujeto con cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón o cáncer de colon. El procedimiento puede causar que el cáncer detenga su proliferación anormal o no aumente en peso o volumen o disminuya en peso o volumen.

#### **Artículos de fabricación:**

- Se describe también en la presente memoria un artículo de fabricación que comprende un envase que contiene la formulación farmacéutica líquida que comprende al menos uno de los anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 descritos en la presente memoria en una formulación que comprende un agente quelante, solo o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente proporciona instrucciones para su uso. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, bolsas y jeringuillas. El envase puede formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. Es un envase ejemplar un vial de vidrio de un solo uso de 3-20 cm<sup>3</sup>. Como alternativa, para una formulación multidosis, el envase puede ser un vial de vidrio de 3-100 cm<sup>3</sup>. El envase contiene la formulación y la etiqueta sobre, o asociada con, el envase puede indicar el modo de empleo. El artículo de fabricación puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, cargas, agujas, jeringuillas y prospectos de envase con instrucciones de uso, contraindicaciones y/o listas de efectos secundarios potenciales.

- Se describe también en la presente memoria un kit para preparar una composición líquida de un anticuerpo estabilizado, que comprende un primer envase que comprende el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 11.2.1 en solución y un segundo envase que comprende una cantidad suficiente de un agente quelante solo o en combinación con otros excipientes en solución para estabilizar el anticuerpo.

- Los siguientes ejemplos ilustran la invención. Se pretende que la memoria descriptiva, junto con los ejemplos, sea considerada solo ejemplar, estando indicado el alcance y espíritu de la invención por las reivindicaciones que siguen a los ejemplos. En los ejemplos, se dan todos los porcentajes en peso a menos que se indique otra cosa. El especialista en la materia apreciará que las cantidades en peso y/o las relaciones en peso a volumen enumeradas en los ejemplos pueden convertirse en moles y/o molaridades usando los pesos moleculares reconocidos en la materia de los ingredientes enumerados. Las cantidades en peso ejemplificadas en la presente memoria (p.ej. gramos) son para los volúmenes (p.ej., de soluciones tampón, formulación de anticuerpo, etc.) enumerados. El especialista en la materia apreciará que las cantidades en peso pueden ajustarse proporcionalmente cuando se desean volúmenes de formulación diferentes.

#### **EJEMPLO 1**

- Este Ejemplo muestra la generación de líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos anti-CTLA-4 como se describe en la patente de EE.UU. n.º. 6.682.736 de Hanson, *et al.*

Los anticuerpos se prepararon seleccionar, y ensayaron como sigue:

Preparación de antígeno: Se prepararon tres inmunógenos distintos para la inmunización de ratones Xenomouse™: (i) una proteína de fusión CTLA-4-IgG, (ii) un péptido CTLA-4 y (iii) células 300.19 de linfoma de murino transfectadas con un mutante de CTLA-4 (Y201V) que se expresa constitutivamente sobre la superficie celular.

Proteína de fusión CTLA-4-IgG1:

5 **Construcción del vector de expresión**

Se amplificó el ADNc que codifica el dominio extracelular maduro de CTLA-4 por PCR a partir de una colección de ADNc de timo humano (Clontech) usando cebadores diseñados para la secuencia publicada (Eur. J. Immunol. 18: 1901-1905 (1988)). Se subclonó direccionalmente el fragmento en pSR5, un plásmido de expresión del virus de Sindbis (InVitrogen), entre el péptido señal de oncostatina M humana y los dominios CH1/CH2/CH3 de IgG gamma 1 humana (IgG1). La proteína de fusión no contiene un dominio de bisagra, pero contiene la cisteína 120 en el dominio extracelular de CTLA-4, formando un dímero covalente. El vector resultante se denominó CTLA-4-IgG1/pSR5. Se confirmó la secuencia del ADNc de CTLA-4-IgG1 completo en el vector en ambas hebras. Se muestra a continuación la secuencia aminoacídica de la proteína CTLA-4-Ig. Se amplificó el dominio extracelular maduro de CD44 por PCR a partir de una colección de linfocitos humanos (Clontech) y se subclonó en pSinRep5, generando una proteína de control con la cola de IgG1 idéntica.

Proteína de fusión OM-CTLA4-IgG1:

**MGVLLTQRLLSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVR**  
**VTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYIC**  
**KVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSLEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC**  
**VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE**  
**YKCKVSNKALPTPEEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA**  
**VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALTHNH**  
**YTQKLSLSLSPGK**

Subrayado: péptido señal

20 Se amplificaron los ADNc del dominio extracelular maduro de CD28 por PCR a partir de una colección de linfocitos humanos (Clontech) y se subclonó entonces en pCDM8 (J. Immunol. 151: 5261-71 (1993)), produciendo una proteína de fusión de IgG1 humana que contiene tanto regiones de escisión de trombina como bisagra. Se clonaron CTLA-4 de tití, macaco cangrejero y Rhesus a partir de ARNm aislado de PBMC estimuladas con PHA usando técnicas estándares de PCR degenerada. La secuenciación demostró que las secuencias aminoacídicas de Rhesus y macaco cangrejero eran idénticas, con tres diferencias con el dominio extracelular de CTLA-4 humano maduro (S13N, I17T y L105M). El tití demostró 10 diferencias aminoacídicas con el dominio extracelular de CTLA-4 humano maduro (V21A, V33I, A41T, A51G, 54I, S71F, Q75K, T88M, L105M y G106S). Se usó mutagénesis dirigida a sitio para hacer mutaciones puntuales individuales de todos los aminoácidos diferentes en CTLA-4 de tití para cartografiar los aminoácidos importantes para la interacción de los anticuerpos con CTLA4-IgG humano. Se generaron mutaciones de CTLA-IgG humano y de tití para cartografía epitópica mediante mutagénesis dirigida a sitio Matchmaker (Promega). Se produjeron las proteínas de fusión de IgG mediante transfección transitoria de células Cos7 y se purificaron usando técnicas de proteína A estándares. Se evaluó en proteínas CTLA4-IgG mutantes la unión a anticuerpos mediante inmunotransferencia y usando análisis BIAcore.

**Expresión/purificación de proteína recombinante**

35 Se generó el virus de Sindbis recombinante por electroporación de ARNm de CTLA-4-IgG1/pSR5 transcrito en células de hámster recién nacido (Gibco) con SP6 *in vitro* y ARNm auxiliar de DH-26S como se describe en InVitrogen. 48 horas después, se recolectó el virus recombinante y se tituló para expresión óptima de proteína en células de ovario de hámster chino (CHO-K1). Se cultivaron las células CHO-K1 en suspensión de DMEM/F12 (Gibco) que contenía 10 % de suero fetal bovino termoinactivado (Gibco), aminoácidos no esenciales (Gibco), glutamina 4 mM (Gibco), penicilina/estreptomina (Gibco), Hepes 10 mM, pH 7,5 (Gibco). Para producir CTLA-4-IgG, se resuspendieron las células CHO-K1 a  $1 \times 10^7$  células/ml en DMEM/F12 y se incubaron con virus de Sindbis durante 1 hora a temperatura ambiente. Se diluyeron entonces las células a  $1 \times 10^6$ /ml en DMEM/F12 que contiene 1 % de suero fetal bovino desprovisto de IgG bovina usando Protein A Sepharose (Pharmacia), aminoácidos no esenciales, glutamina 4 mM, Hepes 12,5 mM, pH 7,5 y penicilina/estreptomina. 48 horas después de la infección, se sedimentaron las células, se recolectó el medio acondicionado y se suplementó con comprimidos de inhibidor de proteasa completo (Boehringer Mannheim), se ajustó el pH a 7,5 y se filtró por 0,2  $\mu$ m (Nalgene). Se usó FPLC (Pharmacia) para purificar por afinidad la proteína de fusión usando una columna de 5 ml Protein A HiTrap

(Pharmacia) a 10 ml/min de caudal. Se lavó la columna con 30 volúmenes de lecho de PBS y se eluyó con glicina 0,1 M/HCl a pH 2,8 a 1 ml/min. Se neutralizaron inmediatamente las fracciones (1 ml) a pH 7,5 con Tris a pH 9. Se identificaron las fracciones que contienen CTLA-4-IgG1 por PAGE-SDS y se concentraron entonces usando Centriplus 50 (Amicon) antes de aplicar a una columna Sepharose 200 (Pharmacia) a 1 ml/min usando PBS como disolvente. Se combinaron las fracciones que contenían CTLA-4-IgG1, se esterilizaron por filtración por 0,2 µm (Millipore), se tomaron alícuotas y se congelaron a -80 °C. Se expresó CD44-IgG1 y se purificó usando los mismos procedimientos. Se purificó CD28-IgG a partir de medio acondicionado de células Cos7 transfectadas transitoriamente.

#### Caracterización de CTLA-4-IgG1:

La CTLA-4-IgG1 purificada migraba como una sola banda en PAGE-SDS usando tinción con Coomassie coloidal (Novex). En condiciones no reductoras, la CTLA-4-IgG1 era un dímero (100 kDa) que se reducía a un monómero de 50 kDa cuando se trataba con DTT 50 mM. La secuenciación aminoacídica de CTLA-4-IgG1 purificada en solución confirmó el extremo N de CTLA-4 (MHVAQPAVVAS) y que el péptido señal de oncostatina M se escindía de la proteína de fusión madura. La CTLA-4-IgG1 se unía a B7.1-IgG inmovilizada de manera dependiente de la concentración y se bloqueaba la unión por un anticuerpo anti-CTLA-4 de hámster anti-humano (BNI3: PharMingen). La CTLA-4-IgG estéril estaba exenta de endotoxinas y se cuantificó por DO280 usando 1,4 como coeficiente de extinción. El rendimiento de CTLA-4-IgG purificada oscilaba entre 0,5-3 m/l de células CHO-K1.

#### Péptido CTLA-4:

Se preparó el siguiente péptido CTLA-4 como se describe a continuación:

NH<sub>2</sub>:MHVAQPAVVASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF  
LDDSICTGTSSGNQ VNLIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPC-CONH<sub>2</sub>

#### Abreviaturas/Materiales:

NMP, *N*-metilpirrolidinona; TFE, 2,2,2-trifluoroetanol; DCM, diclorometano; Fmoc, fluorenilmetoxicarbonilo. Se suministraron todos los reactivos por Perkin Elmer, con las siguientes excepciones: TFE, Aldrich Chemical, resina Fmoc-PAL-PEG, Perseptive Biosystems. Se usaron Fmoc-Arg(PMC)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Lys(BOC)-OH, Fmoc-Ser(tBu)OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH y Fmoc-Tyr(tBu)-OH para aquellos aminoácidos que requerían grupos protectores de cadena lateral.

#### Síntesis peptídica:

Se efectuó la síntesis peptídica en un Perkin-Elmer 431A, retroajustado con monitorización de realimentación mediante absorbancia UV a 301 nm (detector modelo 759A de Perkin-Elmer). Se ensambló la secuencia peptídica en una resina Fmoc-PAL-PEG usando ciclos de acoplamiento dobles condicionales. Se efectuaron acoplamientos dobles forzados en los ciclos 10, 11, 18, 19, 20 y 28 a 33. Se lavó la resina con una mezcla al 50 % de DCM y TFE a la terminación de cada ciclo de acilación, seguido de protección de los grupos amino no reaccionados con anhídrido acético en NMP. Se retiró la resina del reactor después de completar el ciclo 49 y se dejó continuar el resto hasta la terminación. Se efectuó la escisión peptídica de la resina usando el reactivo K (King *et al.* "International Journal of Protein and Peptide Research" 36: 255-266 (1990)) durante 6 horas sobre 415 mg de resina, produciendo 186 mg de péptido CTLA-4 bruto.

#### Caracterización de péptido:

Se disolvieron alícuotas de 25 mg del péptido CTLA-4 bruto en 5 ml de guanidina·HCl 6 M/K<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> 100 mM a pH 6,4 y se eluyeron por una columna Hi Load Superdex 75 16/60 de Pharmacia (16 mmX600 mm, 120 ml de volumen de lecho) con guanidina·HCl 2 M/K<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> 100 mM a pH 6,4 a 2 ml/min durante 180 minutos, recogiendo fracciones de 5 ml. Se analizaron las fracciones cargando 1,7 µl de fracciones en un gel Laemli de NuPAGE con circulación con tampón de circulación MES y visualizando con el protocolo de tinción con plata Daichii. Aquellas fracciones que exhibían un peso molecular de 12 kDa, de acuerdo con los patrones de peso molecular, se combinaron conjuntamente y se almacenaron a 4 °C. Se analizaron las fracciones combinadas por UV y electroforesis en gel. Se efectuó la secuenciación aminoacídica absorbiendo una muestra de 100 µl en un cartucho ProSorb (absorbido en una membrana de PVDF) y lavando para retirar las sales del tampón. Se efectuó la secuenciación en un secuenciador Applied Biosystems 420. Se observó la secuencia N-terminal esperada (MHVAQPAVVLA). La inmunotinción demostró que el péptido se reconocía por el anticuerpo BNI3 anti-CTLA-4 humano (PharMingen). Para desalar, se dispuso una alícuota que contenía 648 µg de material en tubos de diálisis de 3500 Da de MWCO y se dializó frente a 0,1 % de TFA/H<sub>2</sub>O a 4 °C durante 9 días con agitación. Se liofilizaron los contenidos completos de la bolsa de diálisis hasta un polvo.

#### Células "300.19" transfectadas con el antígeno peptídico CTLA-4 (Y201V):

Se amplificó ADNc de CTLA-4 completo por PCR a partir de una colección de ADNc de timo humano (Stratagene) y se subclonó en pIRESneo (Clontech). Se introdujo una mutación de CTLA-4 que da como resultado una expresión constitutiva en la superficie celular usando el sistema de mutagénesis MatchMaker (Promega). La mutación de tirosina, Y201, a valina inhibe la unión a la proteína adaptina AP50 que es responsable de la rápida internalización de CTLA-4 (Chuang, *et al. J. Immunol.* 159: 144-151 (1997)). Se cultivaron células de linfoma de murino 300.19 exentas de micoplasma en RPMI-1640 que contenía 10 % de suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales, penicilina/estreptomicina, glutamina 2 mM, Hepes 12,5 mM a pH 7,5 y beta-mercaptoetanol 25  $\mu$ M. Se electroporaron las células ( $3 \times 10^6$ /0,4 ml de RPMI exento de suero) en una cámara de 1 ml con 20  $\mu$ g de CTLA-4-Y201V/pIRESneo usando 200V/1180  $\mu$ F (Gibco CeliPorator). Se dejaron reposar las células durante 10 minutos y se añadieron entonces 8 ml de medio RPMI completo precalentado. A las 48 horas, se diluyeron las células a  $0,5 \times 10^6$ /ml en medio RPMI completo que contenía G418 1 mg/ml (Gibco). Se expandieron las células resistentes y se mostró que expresaban CTLA-4 sobre la superficie celular usando el anticuerpo BNI3 conjugado con ficoeritrina (PharMingen). Se aislaron las células de alto nivel de expresión por clasificación estéril.

#### ***Inmunización y generación de hibridoma:***

Se inmunizaron ratones Xenomouse™ (de 8 a 10 semanas de edad) (i) por vía subcutánea en la base de las colas con  $1 \times 10^7$  células 300.19 que se transfectaron para expresar CTLA-4 como se describe anteriormente, se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con coadyuvante completo de Freund o (ii) por vía subcutánea en la base de la cola con (a) 10  $\mu$ g de la proteína de fusión de CTLA-4 o (b) 10  $\mu$ g de péptido CTLA-4, emulsionado con coadyuvante completo de Freund. En cada caso, se repitió la dosis 3 o 4 veces con coadyuvante incompleto de Freund. 4 días antes de la fusión, los ratones recibieron una inyección final del inmunógeno o células en PBS. Se fusionaron linfocitos de bazo y/o nódulo linfático de ratones inmunizados con la línea celular P3 de mieloma no secretor de murino y se sometieron a selección por HAT como se describe anteriormente (Galfre, G. y Milstein, C., "Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures." *Methods Enzymol.* 73: 3-46 (1981). Se recuperó un gran panel de hibridomas secretores todos de anticuerpos de IgG<sub>2</sub>K humanos específicos de CTLA-4.

Se depositaron los siguientes anticuerpos anti-CTLA-4 productores de hibridoma diseñados como sigue en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd. Manassas, Va. 20110-2209 el 29 de abril de 2003:

Clon	Subclón	nº de depósito ATCC
11.2.1	11.2.1.4	PTA-5169
4.1.1	4.1.1.1	PTA-5166

#### **EJEMPLO 2**

Este ejemplo muestra la generación de líneas celulares de mamífero recombinantes que producen anticuerpos anti-CTLA-4.

Se clonó ADN que codifica las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal 11.2.1 de la línea celular de hibridoma respectiva 11.2.1 y se determinaron las secuencias de ADN mediante procedimientos conocidos por el especialista en la materia. A partir de la secuencia de ácido nucleico y la secuencia aminoacídica predicha del anticuerpo 11.2.1, se determinó la identidad del uso génico para cada cadena de anticuerpo.

Se subclonaron entonces los insertos de ADN de 11.2.1 en vectores de expresión. Se transfectaron posteriormente los vectores de expresión en una célula hospedadora de mieloma de ratón (NS0), generando diversas líneas celulares transfectantes primarias que producen anticuerpos anti-CTLA. Se eligió la línea celular principal basándose en el análisis de crecimiento y productividad. Se subclonó posteriormente la línea principal, generando una línea celular clonal.

Se produjo el anticuerpo anti-CTLA4 mediante cultivo celular usando la línea celular en un biorreactor que contenía medio de cultivo celular. Se suplementa el medio con nutrientes durante la producción. Después de alcanzar los criterios de recolección, se recolectó el biorreactor por filtración sola o por centrifugación seguida de filtración. Se purificó entonces el sobrenadante clarificado con tres etapas cromatográficas que comprenden una columna de afinidad de proteína A y dos columnas de intercambio iónico. Se realizaron también una inactivación a bajo pH y una filtración vírica para eliminar cualquier virus potencial en el proceso. Se concentra el producto y se diafiltra en el tampón de formulación, formando la sustancia farmacológica.

#### **EJEMPLO 3**

Se realizó un estudio para evaluar el efecto de 4 tampones diferentes sobre la agregación y fragmentación de anticuerpos.

Específicamente, se prepararon 4 formulaciones líquidas que comprendían el anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1 y se tamponaron con acetato, succinato, histidina o EDTA. Se almacenaron entonces las formulaciones a 40 °C y se tomaron medidas de agregación y fragmentación de anticuerpos a las 0, 2, 5 y 7 semanas.

**Preparación de soluciones de tampón:**

- 5 Se prepararon 4 soluciones de tampón como se describe en la Tabla 3. Se preparó cada solución disolviendo en primer lugar una cantidad de la especie de tampón (enumerada en la Tabla 3) en agua (aproximadamente un 80 % del objetivo). Se ajustó entonces el pH de cada solución de tampón a 5,5 mediante la adición de una cantidad suficiente de la solución ácida o básica indicada en la Tabla 3. Después del ajuste del pH, se añadió una cantidad adicional de agua, proporcionando una concentración de tampón final de 20 mM. Se seleccionó una concentración de tampón de 20 mM para asegurar una estabilidad al pH razonable al pH seleccionado de 5,5. Se filtró entonces la solución de tampón a través de un filtro de esterilización (tamaño de poro de 0,22 micrómetros) en un recipiente esterilizado para uso posterior.

Tabla 3: Soluciones de tampón:

<u>Tipo de tampón</u>	<u>Especie de tampón</u>	<u>Concentración de tampón (g/l)</u>	<u>Solución ácida/básica</u>
Acetato	Acetato de sodio trihidratado	2,74	Ácido acético glacial al 1 % v/v
Succinato	Ácido succínico	2,36	NaOH 1 M
Histidina	HCl de L-histidina monohidratado	4,19	NaOH 1 M
EDTA	EDTA de disodio dihidratado	7,45	HCl 5 M

- 15 Se preparó la solución de ácido acético glacial al 1 % v/v mediante dilución apropiada (1 ml a 100 ml) de ácido acético glacial (al 99,9 %) con agua. Se preparó la solución de hidróxido de sodio 1 molar (M) disolviendo 40 g de hidróxido de sodio sólido en 1 l de agua. Se preparó la solución de ácido clorhídrico 5 molar (M) mediante dilución apropiada de ácido clorhídrico concentrado (al 37,8 %) con agua.

**Preparación de formulaciones de anticuerpo:**

- 20 Se enumeran en la Tabla 4 siguiente las formulaciones de anticuerpo que se evaluaron. Para preparar cada formulación, se añadió en primer lugar una cantidad de tonificante (reseñada en mg/ml en la Tabla 4) a la solución de tampón indicada y se agitó la solución hasta que se disolvió el tonificante. Se obtuvo una solución bruta de anticuerpo a partir del proceso de purificación descrito en el Ejemplo 2 con 13,2 mg/ml en tampón acetato de sodio 20 mM a pH 5,5 + cloruro de sodio 140 mM. Se llevaron a cabo los intercambios de tampón de esta solución bruta con las soluciones de formulación anteriormente identificadas con concentradores centrífugos Amicon Ultra 15 MWCO10K (UFC901024) en una centrífuga Beckman Coulter Allegra 21R procesada a 6500 rpm a 5 °C. Se realizaron aproximadamente 8 intercambios de volumen y se concentró la solución de anticuerpo a entre 27 y 30 mg/ml. Se prepararon aproximadamente 3 a 4 ml de las formulaciones 1 a 18. Se determinaron las concentraciones de anticuerpo mediante el procedimiento de espectrometría ultravioleta-visible (UV-Vis) usando un coeficiente de extinción de  $1,43 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 280 nm.

- 35 Se preparó una solución de polisorbato 80 (PS80) 20 mg/ml mediante dilución y disolución de polisorbato 80 con el tampón de formulación apropiado preparado como se describe anteriormente. Se añadió entonces polisorbato 80 a las soluciones de anticuerpo y tampón en forma de concentrado de 20 mg/ml junto con la cantidad apropiada de tampón, anticuerpo, tonificante y agua, obteniendo una solución final 20 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 en la formulación correspondiente a las composiciones de la Tabla 4 siguiente.

Para la formulación nº 2 de la Tabla 4, se añadió PEG3350 en forma de un concentrado de 200 mg/ml en este punto.

- 40 Se filtraron entonces las formulaciones a través de filtros esterilizantes de 0,2 µm y se rellenaron viales. Se usó un volumen de relleno de 0,5 a 1 ml en viales de vidrio de tipo 1 de 2 ml. Se cerraron los viales con tapones recubiertos Daikyo 777-1 FluroteC®, se sellaron por engastado y se dispusieron en cámaras de estabilidad almacenadas verticalmente a 40 °C durante 2, 5 y 7 semanas. Se lavaron los viales y se sometieron a autoclave, así como los tapones de suero de 13 mm Daikyo 777-1. Se analizaron inmediatamente en los viales por duplicado los niveles de agregación y fragmentación.

Tabla 4: Formulaciones de anticuerpo ensayadas:

<u>Nº de formulación</u>	<u>Tipo de tampón 20 mM, pH 5,5</u>	<u>Tonificante (mg/ml)</u>	<u>Tensioactivo (mg/ml)</u>
1	Acetato	NaCl (9)	PS80 (0,2)
2	Acetato	NaCl (9) + PEG3350 (10)	PS80 (0,2)

3	Acetato	Sacarosa (90)	PS80 (0,2)
4	Acetato	Sorbitol (48)	PS80 (0,2)
5	Acetato	Inositol (48)	PS80 (0,2)
6	Acetato	Manitol (41) + glicina (2)	PS80 (0,2)
7	Succinato	Sacarosa (90)	PS80 (0,2)
8	Succinato	Sorbitol (48)	PS80 (0,2)
9	Succinato	Inositol (48)	PS80 (0,2)
10	Succinato	Manitol (41) + glicina (2)	PS80 (0,2)
11	Histidina	Sacarosa (90)	PS80 (0,2)
12	Histidina	Sorbitol (48)	PS80 (0,2)
13	Histidina	Inositol (48)	PS80 (0,2)
14	Histidina	Manitol (41) + glicina (2)	PS80 (0,2)
15	EDTA	Sacarosa (90)	PS80 (0,2)
16	EDTA	Sorbitol (48)	PS80 (0,2)
17	EDTA	Inositol (48)	PS80 (0,2)
18	EDTA	Manitol (41) + glicina (2)	PS80 (0,2)

#### **Análisis de agregación:**

5 Se almacenaron las formulaciones de anticuerpo de la Tabla 4 a una temperatura de 40 °C. En las semanas 0, 2, 5 y 7, se analizó en cada formulación la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se llevó a cabo la cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna TSK gel G3000SWXL-G2000SWXL, de fase móvil tampón fosfato de sodio 0,2 M a pH 7,0, caudal de 1 ml/min y detección UV a 214 nm. La Figura 1 muestra el porcentaje de especies de alto peso molecular eluidas (concretamente, agregados del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 1.2.1) medido en los momentos relevantes para cada una de las formulaciones. Se calcularon los niveles de agregación integrando las áreas bajo los picos de cromatograma para cada formulación y reseñando las áreas integradas bajo los picos de las especies de alto peso molecular como porcentaje del área de pico total (véase la Figura 1). Como puede verse en la Figura 1, las formulaciones tamponadas con EDTA mostraban los menores niveles de agregación, seguidas de las formulaciones tamponadas con histidina, acetato y succinato, en ese orden.

#### **Análisis de fragmentación:**

15 Como se indica anteriormente, se almacenaron las formulaciones de anticuerpo de la Tabla 4 a una temperatura de 40 °C. En las semanas 0, 2, 5 y 7, se analizó también en cada formulación la fragmentación usando PAGE-SDS. Se llevó a cabo el análisis de PAGE-SDS usando gel bis-Tris al 4-12 % de NuPAGE y tinción con azul coloidal (Coomassie). Para los geles reducidos (PAGE-SDS), se consiguió la reducción con el agente reductor NuPAGE®. Se estimaron las impurezas hidrolíticas totales (concretamente, fragmentos del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 11.2.1) explorando con el uso de un densitómetro Molecular Dynamics Personal Densitometer PDQC-90 o un densitómetro Bio-Rad GS800 Imaging Densitometer. La Figura 2 muestra el porcentaje de fragmentación medido en los momentos relevantes para cada una de las formulaciones. Se calcularon los niveles de fragmentación como un porcentaje del volumen de banda total (véase la Figura 2). Como puede verse en la Figura 2, las formulaciones tamponadas con EDTA mostraban los menores niveles de fragmentación, seguidas por las formulaciones tamponadas con histidina, acetato y succinato, en ese orden.

25 La Tabla 5(a) (0 semanas), Tabla 5(b) (2 semanas), Tabla 5(c) (5 semanas) y Tabla 5(d) (7 semanas) siguientes reseñan los datos de agregación y fragmentación que se presentan gráficamente en las Figuras 1 y 2.

Tabla 5(a): Resultados de agregación y fragmentación en el punto temporal 0:

<b>Nº de formulación</b>	<b>Porcentaje de agregación</b>	<b>Porcentaje de fragmentación</b>
1	0,4 %	0,62 %
2	0,4 %	0,66 %
3	0,3 %	0,53 %
4	0,4 %	0,49 %
5	0,4 %	0,67 %
6	0,3 %	0,56 %
7	0,3 %	0,46 %
8	0,4 %	0,62 %
9	0,4 %	0,49 %
10	0,3 %	0,51 %
11	0,3 %	0,64 %

ES 2 707 284 T3

12	0,3 %	0,62 %
13	0,3 %	0,47 %
14	0,3 %	0,37 %
15	0,3 %	0,42 %
16	0,3 %	0,50 %
17	0,3 %	0,49 %
18	0,3 %	0,47 %

Tabla 5(b): Resultados de agregación y fragmentación en el punto temporal de 2 semanas:

<b>Nº de formulación</b>	<b>Porcentaje de agregación</b>	<b>Porcentaje de fragmentación</b>
1	0,7 %	1,52 %
2	0,7 %	1,35 %
3	0,5 %	1,16 %
4	0,5 %	1,13 %
5	0,5 %	1,10 %
6	0,4 %	1,34 %
7	0,6 %	1,34 %
8	0,6 %	1,44 %
9	0,6 %	1,22 %
10	0,5 %	1,16 %
11	0,4 %	1,29 %
12	0,4 %	1,19 %
13	0,4 %	1,00 %
14	0,4 %	1,00 %
15	0,5 %	1,24 %
16	0,5 %	1,00 %
17	0,5 %	1,07 %
18	0,5 %	0,96 %

Tabla 5(c): Resultados de agregación y fragmentación en el punto temporal de 5 semanas:

<b>Nº de formulación</b>	<b>Porcentaje de agregación</b>	<b>Porcentaje de fragmentación</b>
1	0,8 %	1,40 %
2	0,9 %	1,59 %
3	1,2 %	2,61 %
4	1,1 %	1,49 %
5	1,0 %	2,12 %
6	1,7 %	1,56 %
7	1,7 %	2,50 %
8	1,4 %	1,86 %
9	1,4 %	2,03 %
10	0,9 %	1,46 %
11	0,6 %	1,42 %
12	0,7 %	1,36 %
13	0,6 %	1,03 %
14	0,5 %	1,05 %
15	0,5 %	1,21 %
16	0,5 %	0,78 %
17	0,6 %	1,27 %
18	0,5 %	1,25 %

Tabla 5(d): Resultados de agregación y fragmentación en el punto temporal de 7 semanas:

<b>Nº de formulación</b>	<b>Porcentaje de agregación</b>	<b>Porcentaje de fragmentación</b>
1	1,4 %	2,39 %
2	1,2 %	1,90 %
3	1,4 %	1,89 %
4	1,8 %	2,96 %
5	1,3 %	1,92 %
6	1,1 %	1,77 %
7	1,2 %	1,97 %
8	2,2 %	2,91 %
9	2,4 %	3,25 %
10	1,3 %	1,82 %
11	0,9 %	1,34 %

<b>Nº de formulación</b>	<b>Porcentaje de agregación</b>	<b>Porcentaje de fragmentación</b>
12	0,9 %	1,33 %
13	0,7 %	1,12 %
14	0,6 %	0,92 %
15	0,6 %	1,04 %
16	0,6 %	1,18 %
17	0,6 %	1,01 %
18	0,6 %	1,18 %

#### EJEMPLO 4

Se realizó un estudio para evaluar la capacidad de distintas formulaciones líquidas que comprenden el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 11.2.1 de tolerar múltiples ciclos de congelación y descongelación.

- 5 Se evalúa a menudo la capacidad de una formulación líquida de soportar múltiples ciclos de congelación/descongelación para determinar si la formulación puede almacenarse (y, si se desea, transportarse) congelada y descongelarse después para uso posterior.

10 Se enumeran en la Tabla 6 siguiente las formulaciones que se evaluaron. El procedimiento usado para preparar las formulaciones es el mismo que el descrito en el Ejemplo 3. Se dispusieron 2,5 ml de cada solución en viales de vidrio de tipo 1 de 5 ml, se taparon y se sellaron. Las formulaciones identificadas a continuación con los números 1 a 4, 7 a 8, 11 a 12 y 15 a 16 eran idénticas a las formulaciones que tienen los mismos identificadores numéricos en el Ejemplo 3.

Tabla 6: Formulaciones de anticuerpo ensayadas:

<b>Nº de formulación</b>	<b>Tipo de tampón 20 mM, pH 5,5</b>	<b>Tonificante (mg/ml)</b>	<b>Tensioactivo (mg/ml)</b>
1	Acetato	NaCl (9)	PS80 (0,2)
2	Acetato	NaCl (9) + PEG3350 (10)	PS80 (0,2)
3	Acetato	Sacarosa (90)	PS80 (0,2)
4	Acetato	Sorbitol (48)	PS80 (0,2)
19	Acetato	Trehalosa (90)	PS80 (0,2)
20	Succinato	NaCl (9)	PS80 (0,2)
21	Succinato	NaCl (9) + PEG3350 (10)	PS80 (0,2)
7	Succinato	Sacarosa (90)	PS80 (0,2)
8	Succinato	Sorbitol (48)	PS80 (0,2)
22	Histidina	NaCl (9)	PS80 (0,2)
23	Histidina	NaCl (9) + PEG3350 (10)	PS80 (0,2)
11	Histidina	Sacarosa (90)	PS80 (0,2)
12	Histidina	Sorbitol (48)	PS80 (0,2)
24	EDTA	NaCl (9)	PS80 (0,2)
25	EDTA	NaCl (9) + PEG3350 (10)	PS80 (0,2)
15	EDTA	Sacarosa (90)	PS80 (0,2)
16	EDTA	Sorbitol (48)	PS80 (0,2)

- 15 Se sometió cada formulación a 6 ciclos consecutivos de congelación/descongelación. Se llevaron a cabo los tres primeros ciclos en un congelador de velocidad controlada. Los últimos tres ciclos eran ciclos más lentos llevados a cabo con una serie de viales rellenos de agua correspondientes a una alta carga térmica dispuestos en un congelador o nevera. Para los ciclos 1, 2 y 3, se dispusieron los viales que contienen las formulaciones en un congelador de velocidad controlada (Planer Kryo 560-16) y se sometieron al siguiente ciclo: enfriar la formulación a una velocidad de 0,2 °C/min hasta alcanzar una temperatura de -70 °C, mantener a -70 °C durante 1,5 a 3 horas y descongelar la formulación a una velocidad de 0,3 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 5 °C. Para los ciclos 4, 5 y 6, se dispusieron los viales en una caja junto con otros viales rellenos con agua (un vial de muestra por cada formulación; 17 viales de formulación con un total de 30 viales rellenos con agua). Se dispuso entonces esta caja en un congelador mantenido a una temperatura de congelador de -70 °C durante aproximadamente 17 horas, y se dispuso entonces en una nevera mantenida a una temperatura de 2-8 °C durante aproximadamente 50 horas. Una sonda térmica de registro dispuesta en la caja midió una velocidad de enfriamiento media de 0,09 °C/min para el proceso de congelación y una velocidad de calentamiento media de 0,03 °C/min para el proceso de descongelación.
- 20
- 25

Se evaluó visualmente en cada formulación después de cada ciclo de congelación/descongelación la formación de partículas, el cambio de color y el cambio de turbidez. Se efectuaron dichas observaciones visuales de cada formulación en una caja iluminada frente a fondos en blanco y negro, mientras la formulación seguía aún fría después de cada descongelación. La Tabla 7 (siguiente) reseña los resultados.

5 Tabla 7: Evaluaciones visuales de la estabilidad de congelación/descongelación del anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1

Nº	ID	1xCD	2xCD	3xCD	4xCD	5xCD	6xCD	% de aumento de las partículas (SEC)
1	Ac + NaCl	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	Turbio	Muchas partículas	Muchas partículas	0,7
2	Ac + NaCl + PEG	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	Copos	Opaco con copos	Pocas partículas	0
3	Ac + sacarosa	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	0,1				
4	Ac + sorbitol	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	0,1				
19	Ac + trehalosa	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	0				
20	Succ + NaCl	Pocas partículas	Pocas partículas	Más partículas	Más partículas	Opaco, copos, partículas	Muchas partículas	1,3
21	Succ + NaCl + PEG	Incoloro, sin partículas	Pocas partículas	Pocas partículas	Opaco	Opaco	Pocas partículas	0,2
7	Succ + sacarosa	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	0,1				
8	Succ + sorbitol	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	0				
22	Hist + NaCl	Incoloro, sin partículas	Turbio	Turbio	Opaco, copos	Opaco	Opaco, turbio, copos	1,1
23	Hist + NaCl + PEG	Incoloro, sin partículas	Turbio	Pocas partículas	Incoloro, sin partículas	Opaco, copos, pocas partículas	Pocas partículas	0,1
11	Hist + sacarosa	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	0,1				
12	Hist + sorbitol	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	0				
24	Ed + NaCl	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	Opaco, pocas partículas	Muchas partículas	Muchas partículas, opaco	0,1
25	Ed + NaCl + PEG	Incoloro, sin partículas	Turbio, pocas partículas	Opaco, copos	Opaco	Opaco, copos	Pocas partículas	0,1
15	Ed + sacarosa	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	0				
16	Ed + sorbitol	Incoloro, sin partículas	Incoloro, sin partículas	0,1				

Las formulaciones que contienen solo cloruro de sodio (concretamente, iones cloruro) exhibían un mayor aumento de los niveles de partículas solubles después de los ciclos de congelación/descongelación que las formulaciones que contienen trehalosa, sacarosa o sorbitol. La adición de PEG a las formulaciones que contienen cloruro de sodio, sin embargo, parecía reducir los niveles de partículas solubles medidos después de los ciclos de congelación/descongelación respecto a las correspondientes formulaciones que no contienen PEG.

#### **Análisis de agregación:**

Además, se midió el porcentaje de aumento de partículas solubles para cada formulación después de 6 ciclos consecutivos de congelación/descongelación usando cromatografía de exclusión por tamaño.

Después del 6º ciclo de congelación/descongelación, se analizó en cada formulación la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño. Se llevó a cabo la cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna TSK gel G3000SWXL-G2000SWXL, con fase móvil tampón de fosfato de sodio 0,2 M a pH 7,0, caudal de 1 ml/min, y detección UV a 214 nm. La Tabla 7 muestra el porcentaje de especies de alto peso molecular eluidas (concretamente, agregados del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 11.2.1) medido en los momentos relevantes para cada una de las formulaciones. Se calcularon los niveles de agregación integrando las áreas bajo los picos de cromatograma para cada formulación y reseñando las áreas integradas bajo los picos de especies de alto peso molecular como porcentaje del área de pico total (véase la Tabla 7). Como puede verse en la Tabla 7, las formulaciones tamponadas con EDTA mostraban los menores niveles de agregación, seguidas de las formulaciones tamponadas con histidina, acetato y succinato, en ese orden.

#### **EJEMPLO 5**

Se realizó un estudio para evaluar el efecto de EDTA, metionina y condiciones anaeróbicas sobre la decoloración y agregación en formulaciones líquidas que comprenden el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 11.2.1. La decoloración y agregación en dichas formulaciones líquidas son generalmente indeseables desde la perspectiva estética del producto, la perspectiva de integridad del producto o ambas.

La Tabla 8 siguiente enumera los tratamientos de formulación que se evaluaron. El procedimiento general usado para preparar las formulaciones fue el mismo que el descrito en el Ejemplo 3. Para este ejemplo, se preparó una formulación de partida que comprende el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 11.2.1 (5 mg/ml), un tampón de acetato de sodio (20 mM), cloruro de sodio (8,2 mg/ml) y polisorbato 80 (0,2 mg/ml) que tiene un pH 5,5 y se añadió a varios viales de vidrio de 10 ml que contienen tapones de sellado para permitir un muestreo aséptico.

Se efectuaron diversos tratamientos en la formulación de partida según la Tabla 8 siguiente. Como se indica en la Tabla 8, se añadió metionina a algunos de los viales. Se añadieron a los demás viales dos concentraciones diferentes de EDTA. Se añadió gas nitrógeno a los espacios de cabeza de viales que contienen EDTA o metionina seleccionados. Además, se desgasificaron algunos de los viales no tratados restantes antes de la inyección de gas nitrógeno en sus espacios de cabeza. Adicionalmente, se dejaron algunos de los viales restantes sin tratar para actuar como controles experimentales.

Se almacenaron dos viales de cada uno de los tratamientos de la Tabla 8 a 40 °C durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16 y 18 semanas. Se usó uno de los dos viales almacenados en cada punto temporal para evaluaciones visuales del color, mientras que el otro vial se muestreó asépticamente para medir el nivel de agregación del anticuerpo 11.2.1 después del almacenamiento. Las Tablas 9 y 10 reseñan los resultados.

Tabla 8: Tratamientos de formulación de anticuerpo ensayados:

<b>Nº de formulación</b>	<b>Identificación del tratamiento</b>	<b>Tratamiento</b>
26	Sin tratamiento	Ninguno
27	+ gas N <sub>2</sub> en el espacio de cabeza	Se cambió el espacio de cabeza en el vial por gas nitrógeno en liofilizador por evacuación y reemplazo
28	+ desgasificación + gas N <sub>2</sub> en el espacio de cabeza	Se desgasificó en liofilizador y se cambió el espacio de cabeza en el vial por nitrógeno en liofilizador como en el nº 2 anterior
29	+ metionina 26,6 mM	Se añadió metionina 26,6 mM en forma sólida
30	+ gas N <sub>2</sub> en el espacio de cabeza + metionina 26,6 mM	Se añadió metionina 26,6 mM en forma sólida y se cambió el espacio de cabeza en el vial por nitrógeno en liofilizador como en el nº 2 anterior
31	+ Na <sub>2</sub> EDTA al 0,005 %	Se añadió Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O al 0,005 % en forma sólida
32	+ metionina 26,6 mM + Na <sub>2</sub> EDTA al 0,005 %	Se añadieron metionina 26,6 mM y Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O al 0,005 % en forma sólida
33	+ Na <sub>2</sub> EDTA al 0,01 %	Se añadió Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O al 0,01 % en forma sólida

40

**Análisis de la apariencia de la formulación:**

Se evaluó visualmente en cada formulación después de 0 (inicial), 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16 y 18 semanas la formación de partículas, cambio de color y cambio de turbidez. Se reseñaron las observaciones visuales en la Tabla 9.

Tabla 9: Evaluaciones visuales después de los tratamientos de formulación de la Tabla 8:

Nº	Tratam. del vial	Inicial	40 °C, 2 sem	40 °C, 4 sem	40 °C, 6 sem	40 °C, 8 sem	40 °C, 10 sem	40 °C, 12 sem	40 °C, 14 sem	40 °C, 16 sem	40 °C, 18 sem
26	Sin tratam.	Trans. e incol.	Trans. e incol.	Rosa							
27	+ N <sub>2</sub>	Trans. e incol.	Trans. e incol.	Rosa							
28	+ desgasificación + N <sub>2</sub>	Trans. e incol.	Trans. e incol.	Rosa							
29	+ metionina 26,6 mM	Trans. e incol.									
30	+ N <sub>2</sub> + metionina 26,6 mM	Trans. e incol.									
31	+ Na <sub>2</sub> EDTA al 0,005 %	Trans. e incol.									
32	+ metionina 26,6 mM + Na <sub>2</sub> EDTA al 0,005 %	Trans. e incol.									
33	+ Na <sub>2</sub> EDTA al 0,01 %	Trans. e incol.									

5

Los resultados en la Tabla 9 indican que las formulaciones sin EDTA y/o metionina desarrollaban una coloración rosa en el vial después de almacenamiento durante al menos 4 semanas a 40 °C. Aun sin desear ligarse a teoría particular alguna, se cree que este cambio de color puede ser debido, al menos en parte, a un proceso oxidativo. Sin embargo, el cambio de color puede ser debido también a cualquier serie de otros procesos que no están relacionados con la oxidación.

10

La adición de gas nitrógeno al espacio de cabeza de los viales parecía tener menos efecto de reducción de la decoloración que la adición de metionina y/o EDTA.

**Análisis de agregación:**

Se almacenaron las formulaciones de anticuerpo tratadas según la Tabla 8 a una temperatura de 40 °C. En las semanas 0, 2, 6, 8, 10, 14, 16 y 18, se analizó en cada formulación la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño. Se llevó a cabo la cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna TSK gel G3000SWXL-G2000SWXL, fase móvil tampón de fosfato de sodio 0,2 M a pH 7,0, caudal de 1 ml/min y detección UV a 214 nm. La Tabla 10 muestra el porcentaje de especies de alto peso molecular eluidas (concretamente, agregados del anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1) medido en los momentos relevantes para cada uno de los tratamientos de formulación. Se calcularon los niveles de agregación integrando las áreas bajo los picos de cromatograma para cada formulación y reseñando las áreas integradas bajo los picos de especies de alto peso molecular como porcentaje del área de pico total (véase la Tabla 10).

15

20

Tabla 10: Porcentaje de agregación para los tratamientos de formulación de la Tabla 8:

Nº	Tratamiento del vial	Inicial	40 °C, 2 sem	40 °C, 4 sem	40 °C, 6 sem	40 °C, 8 sem	40 °C, 10 sem	40 °C, 12 sem	40 °C, 14 sem	40 °C, 16 sem	40 °C, 18 sem
26	Sin tratamiento	0,2 %	0,8 %	2,3 %	3,5 %	4,6 %	5,31 %	4,3 %	8,8 %	7,7 %	7,1 %
27	+ N <sub>2</sub>	0,2 %	0,7 %	2,3 %	3,8 %	4,4 %	4,82 %	4,5 %	6,5 %	6,0 %	5,5 %
28	+ desgasificación + N <sub>2</sub>	0,2 %	0,3 %	0,9 %	1,4 %	2,5 %	3,68 %	4,3 %	-	4,6 %	4,8 %
29	+ metionina 26,6	0,2 %	0,2 %	0,5 %	0,5 %	0,6 %	0,59 %	0,5 %	0,7 %	0,8 %	0,7 %

	mM											
30	+ N <sub>2</sub> + metionina 26,6 mM	0,2 %	0,2 %	0,5 %	0,4 %	0,4 %	0,51 %	0,5 %	0,5 %	0,7 %	0,7 %	
31	+ Na <sub>2</sub> EDTA al 0,005 %	0,2 %	0,2 %	0,4 %	0,6 %	0,5 %	0,69 %	0,8 %	1,0 %	1,0 %	0,8 %	
32	+ metionina 26,6 mM + Na <sub>2</sub> EDTA al 0,005 %	0,2 %	0,3 %	0,3 %	0,4 %	0,4 %	0,35 %	0,4 %	0,8 %	0,5 %	0,7 %	
33	+ Na <sub>2</sub> EDTA al 0,01 %	0,2 %	0,2 %	0,4 %	0,6 %	0,6 %	0,73 %	0,3 %	1,2 %	1,0 %	1,2 %	

5 Los resultados en la Tabla 9 indican que las formulaciones sin EDTA y/ metionina empiezan a desarrollar una coloración rosa en el vial después de almacenamiento durante al menos 4 semanas a 40 °C. Como puede verse en la Tabla 10, las formulaciones tratadas con EDTA y/o metionina mostraban los menores niveles de agregación, seguidas por las formulaciones tratadas con gas nitrógeno y de control no tratadas.

#### EJEMPLO 6

Se realizó un estudio para evaluar el efecto de metionina y EDTA sobre la oxidación de ciertos residuos aminoacídicos de metionina en el anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1 después de almacenamiento como formulación líquida.

#### 10 **Análisis de oxidación de metionina:**

Se midieron los niveles de oxidación de los residuos de metionina en las posiciones aminoacídicas 256 y 432 en el anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1 mediante un procedimiento de cartografía por Lys-C después de almacenamiento durante 8 semanas a 40 °C.

15 Se muestrearon asépticamente viales de vidrio que contenían las formulaciones nº 26, 29 y 33 (Tabla 8) y sus tratamientos del Ejemplo 5 en el punto temporal de 8 semanas. Se digirieron entonces las muestras con enzima Lys-C en tampón tris a pH 8,0 en condiciones estándares y se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa. Se logró la separación usando una columna analítica Grace Vydac Protein C4 con elución en gradiente de TFA al 0,1 % en agua y TFA al 0,085 % en acetonitrilo.

20 Tabla 11: Porcentaje de oxidación de los aminoácidos metionina en el anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1 después de los tratamientos de la Tabla 8:

<b>Nº de formulación</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Porcentaje de oxidación de Met 432</b>	<b>Porcentaje de oxidación de Met 256</b>
	Inicial	2,3 %	4,9 %
26	Sin tratamiento	15,4 %	32,9 %
29	+ metionina 26,6 mM	0,5 %	1,1 %
33	+ Na <sub>2</sub> EDTA al 0,01 %	1,6 %	3,3 %

Los resultados de la Tabla 11 indican que la adición de metionina o EDTA a la formulación de anticuerpo 11.2.1 reduce el porcentaje de oxidación en los dos residuos de metionina indicados, en comparación con la formulación almacenada sin EDTA ni metionina.

#### 25 EJEMPLO 7

Se realizó un estudio para evaluar la oxidación de ciertos residuos aminoacídicos de triptófano y tirosina en el anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1.

30 Se encontró que las formulaciones de anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1 que desarrollan una decoloración rosa con el tiempo tienen un máximo de absorción característico a 500 nm después de realizar la espectroscopia ultravioleta/visible (UV-Vis).

35 El procedimiento usado para preparar la formulación es el mismo que el descrito en el Ejemplo 3. Para este ejemplo, se almacenó una formulación que comprende una solución del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-3 11.2.1 5 mg/ml en tampón de acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 8,2 mg/ml y polisorbato 80 0,2 mg/ml (a pH 5,5) en dos viales de vidrio durante 4 semanas a 40 °C, en cuyo tiempo las formulaciones habían desarrollado una decoloración rosa.

Se sometió entonces la solución de una de las formulaciones de viales decoloradas a filtración de peso molecular (corte), que permitía pasar los excipientes de formulación a través del dispositivo de filtración dejando detrás los

anticuerpos. El eluyente de filtración (p.ej., agua y excipientes) era transparente e incoloro, mientras que la fracción recogida (p.ej., anticuerpo 11.2.1) permanecía rosa. Por tanto, el experimento de filtración indicaba que la decoloración rosa estaba relacionada con el anticuerpo 11.2.1 mismo en contraposición con surgir de los excipientes de la formulación.

- 5 A continuación, se digirió con tripsina el segundo vial que tiene decoloración rosa en condiciones estándares y se analizó por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa acoplada con espectrometría de masas (CL-EM). Se logró la separación usando una columna analítica Grace Vydac Protein C4 con elución de gradiente de TFA al 0,1 % en agua y TFA al 0,085 % en acetonitrilo. Se monitorizó la absorbancia UV-vis de los péptidos digeridos a 500 nm y se identificaron los correspondientes péptidos basándose en su peso molecular.
- 10 El péptido triptico, que se correlaciona con el pico de absorbancia a 500 nm, tenía la secuencia aminoacídica: GLEWVAVIWDGSNK. Se digirió adicionalmente entonces la secuencia peptídica GLEWVAVIWDGSNK con proteasa Asp-N en condiciones estándares, y el pico de absorbancia de 500 nm (UV-vis) migraba junto con el péptido digerido con proteasa Asp-N, que tenía la secuencia aminoacídica: GLEWVAVIWY.
- 15 Por lo tanto, sin pretender ligarse a teoría particular alguna, se cree que uno cualquiera o ambos de los dos residuos aminoacídicos de triptófano (W) o el residuo de tirosina (Y) en el péptido digerido con proteasa (GLEWVAVIWY) son posibles sitios de oxidación, que pueden haber sido responsables de la decoloración rosa de la formulación de anticuerpo 11.2.1 en este ejemplo. En particular, se cree que uno cualquiera o ambos de los dos residuos aminoacídicos de triptófano (W) en el péptido digerido con proteasa (GLEWVAVIWY) son posibles sitios de oxidación, que pueden haber sido responsables de la decoloración rosa.
- 20 Sin embargo, también es posible que mecanismos distintos de la oxidación hayan sido los responsables de una cualquiera o más de las decoloraciones particulares (p.ej., rosa y amarillo) vistas en las diversas formulaciones evaluadas en la presente memoria.

#### EJEMPLO 8

- 25 Se realizó un estudio para evaluar el efecto de EDTA y DTPA sobre la decoloración, agregación y fragmentación del anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1.

Específicamente, se prepararon tres formulaciones líquidas que comprenden anticuerpo 11.2.1 con y sin EDTA y DTPA. Se almacenaron las formulaciones a 40 °C y se realizaron evaluaciones de decoloración, agregación y fragmentación de anticuerpo a las 0, 2, 4, 6, 8 y 10 semanas.

- 30 Para este ejemplo, se preparó una solución de anticuerpo anti-CTLA-4 20 mg/ml en tampón de acetato de sodio 20 mM a pH 5,5 con cloruro de sodio 8,2 mg/ml y polisorbato 80 0,2 mg/ml, se dividió entre varios viales de vidrio, como se describe en el Ejemplo 3, y se trató entonces mediante la adición de EDTA o DTPA. Se añadieron EDTA y DTPA a los viales de formulación en forma de sólidos. Se analizaron inmediatamente en varios viales los niveles de decoloración, agregación y fragmentación y se almacenaron varios otros viales por duplicado verticalmente a 40 °C durante 2, 4, 6, 8 y 10 semanas.

- 35 Se muestrearon entonces asepticamente los viales tratados y no tratados para medir el nivel de agregación y fragmentación del anticuerpo 11.2.1 en las formulaciones en los puntos temporales de 2, 4, 6, 8 y 10 semanas y se observó la decoloración. Las Tablas 12 y 13 reseñan los resultados.

#### **Análisis de la apariencia de la formulación:**

- 40 Se evaluó visualmente en cada formulación después de 0 (inicial), 2, 4, 6, 8 y 10 semanas la formación de partículas, cambio de color y cambio de turbidez. Se reseñaron las observaciones visuales en la Tabla 12.

Tabla 12: Evaluaciones visuales de los tratamientos de formulación de EDTA y DTPA:

<b>Nº</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>0 semanas Inicial</b>	<b>2 semanas a 40 °C</b>	<b>4 semanas a 40 °C</b>	<b>6 semanas a 40 °C</b>	<b>8 semanas a 40 °C</b>	<b>10 semanas a 40 °C</b>
26	Sin tratamiento	Trans. e incol.	Trans. e incol.	Trans. e incol.	Rosa	Rosa	Rosa
33	+ Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O al 0,01 %	Trans. e incol.					
34	+ DTPA al 0,01 %	Trans. e incol.					

Los resultados de la Tabla 12 indican que las formulaciones sin EDTA o DTPA desarrollaban una coloración rosa en el vial después de almacenamiento durante al menos 6 semanas a 40 °C.

**Análisis de agregación:**

Se almacenaron las formulaciones de anticuerpo tratadas según la Tabla 12 a una temperatura de 40 °C. En la semanas 0, 2, 6, 8 y 10, se analizó en cada formulación la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño. Se llevó a cabo la cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna de TSK gel G3000SWXL-G2000SWXL, fase móvil tampón de fosfato de sodio 0,2 M a pH 7,0, caudal de 1 ml/min y detección UV a 214 nm. La Tabla 13 muestra el porcentaje de especies de alto peso molecular eluidas (concretamente, agregados del anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1) medido en los momentos relevantes para cada uno de los tratamientos de formulación. Se calcularon los niveles de agregación integrando las áreas bajo los picos de cromatograma para cada formulación y reseñando las áreas integradas bajo los picos de las especies de alto peso molecular como porcentaje del área de pico total (véase la Tabla 13).

Tabla 13: Agregación porcentual por tratamientos de formulación con EDTA y DTPA:

Nº	Tratamiento	0 semanas Inicial	2 semanas a 40 °C	4 semanas a 40 °C	6 semanas a 40 °C	8 semanas a 40 °C	10 semanas a 40 °C
26	Sin tratamiento	0,6 %	0,9 %	1,4 %	2,2 %	2,6 %	3,2 %
33	+ Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O al 0,01 %	0,7 %	0,8 %	0,9 %	0,9 %	1,0 %	1,2 %
34	+ DTPA al 0,01 %	0,5 %	0,7 %	0,8 %	0,9 %	0,9 %	0,9 %

Como puede verse en la Tabla 7, tanto las formulaciones que contienen EDTA como DTPA mostraban menores niveles de agregación en comparación con la formulación sin EDTA o DTPA.

**EJEMPLO 9**

Se realizó un estudio para evaluar el efecto de EDTA y gas nitrógeno sobre la estabilidad del anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1.

Específicamente, se analizó el impacto de EDTA y gas nitrógeno sobre la estabilidad del anticuerpo 11.2.1 con respecto a la decoloración, agregación, oxidación, fragmentación y formación de especies cargadas en formulaciones tamponadas con histidina que contienen trehalosa y polisorbato 80.

Se enumeran en la Tabla 13 siguiente las formulaciones que se evaluaron. El procedimiento usado para preparar las formulaciones es el mismo que el descrito a continuación en el Ejemplo 10. Se almacenaron las formulaciones a 40 °C y se realizaron las evaluaciones de estabilidad a las 0, 4, 8, 12 y 24 semanas.

Para este ejemplo, se preparó una solución de anticuerpo anti-CTLA-4 20 mg/ml en tampón de histidina 20 mM a pH 5,5 con trehalosa 84 mg/ml y polisorbato 80 0,2 mg/ml como en el Ejemplo 10. Se preparó una parte de la formulación diluyendo una solución madre concentrada del anticuerpo con diluciones madre de trehalosa y polisorbato 80 hasta la composición final de anticuerpo anti-CTLA-4 20 mg/ml. Se preparó una segunda parte de la formulación de forma similar, excepto por la etapa adicional de adición de un concentrado de Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 10 mg/ml para conseguir una concentración final de 0,1 mg/ml. Se dispensaron entonces las formulaciones a 1 ml por vial de vidrio de 2 ml. Se dispusieron entonces la mitad de los viales de cada formulación en un liofilizador y se cambió el espacio de cabeza a nitrógeno después de la evacuación. Después de cargar los viales con nitrógeno, la medida de sus niveles de oxígeno reseñaba aproximadamente de 1,5 a 1,6 % de oxígeno, mientras que los viales con aire en el espacio de cabeza reseñaban de aproximadamente 19,7 a 20 % de oxígeno.

Se analizaron inmediatamente en varios viales los niveles de decoloración, agregación, fragmentación, oxidación y formación de especies cargadas y se almacenaron también verticalmente varios otros viales duplicados a 40 °C durante 2, 4, 8, 12 y 24 semanas. En cada punto temporal, se retiraron dos viales almacenados por tratamiento de cada condición, para medir el nivel de agregación, fragmentación, oxidación y formación de especies cargadas del anticuerpo 11.2.1 en las formulaciones y se observó la decoloración. Las Tablas 14 a 18 reseñan los resultados.

Tabla 13. Formulaciones de anticuerpo ensayadas:

Nº	Espacio de cabeza del vial	Tampón	Tonificante	Tensioactivo	Agente quelante
35	Aire	Histidina	Trehalosa	Polisorbato 80	-
36	Nitrógeno	Histidina	Trehalosa	Polisorbato 80	-
37	Aire	Histidina	Trehalosa	Polisorbato 80	EDTA
38	Nitrógeno	Histidina	Trehalosa	Polisorbato 80	EDTA

**Análisis de la apariencia de la formulación:**

Se evaluó visualmente en cada formulación después de 0 (inicial), 4, 8, 12 y 24 semanas la formación de partículas, cambio de color y cambio de turbidez. Se reseñaron las observaciones visuales en la Tabla 14.

Tabla 14: Evaluaciones visuales después de los tratamientos de formulación de la Tabla 13:

Nº	Tratamiento	0 semanas inicial	4 semanas a 40 °C	8 semanas a 40 °C	12 semanas a 40 °C	24 semanas a 40 °C
35	+ aire en el espacio de cabeza	Transparente, sin partículas	Muy ligeramente rosa, menos de 3 partículas	Muy ligeramente rosa, sin partículas	Ligeramente rosa, sin partículas	Ligeramente rosa, sin partículas
36	+ nitrógeno en el espacio de cabeza	Transparente, sin partículas	Transparente, sin partículas	Transparente, sin partículas	Muy ligeramente rosa, sin partículas	Muy ligeramente rosa, sin partículas
37	+ aire en el espacio de cabeza + EDTA	Transparente, sin partículas	Transparente, sin partículas	Transparente, menos de 3 partículas	Transparente, sin partículas	Transparente, sin partículas
38	+ nitrógeno en el espacio de cabeza + EDTA	Transparente, sin partículas	Transparente, sin partículas	Transparente, sin partículas	Transparente, sin partículas	Transparente, sin partículas

Los resultados en la Tabla 14 indican que la formulación sin EDTA ni gas nitrógeno desarrollaba una coloración rosa después de almacenamiento durante 4 semanas a 40 °C. La Tabla 14 indica también que la formulación que tiene el aire del espacio de cabeza del vial reemplazado por gas nitrógeno retrasaba el inicio de la decoloración rosa hasta la semana 12. Ambas formulaciones que contienen EDTA no tuvieron decoloración visible durante al menos 24 semanas.

#### **Análisis de agregación:**

Se almacenaron las formulaciones de anticuerpo preparadas según la Tabla 13 a una temperatura de 40 °C. En las semanas 0, 4, 8, 12 y 24, se analizó en cada formulación la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño. Se muestrearon asépticamente los viales de formulación en cada punto temporal. Se llevó a cabo la cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras usando una columna TSK gel G3000SWXL-G2000SWXL, fase móvil tampón de fosfato de sodio 0,2 M a pH 7,0, caudal de 1 ml/min y detección UV a 214 nm. La Tabla 15 muestra el porcentaje de especies de alto peso molecular eluidas (concretamente, agregados del anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1) medido en los momentos relevantes para cada uno de los tratamientos de formulación. Se calcularon los niveles de agregación integrando las áreas bajo los picos de cromatograma para cada formulación y reseñando las áreas integradas bajo los picos de especies de alto peso molecular como porcentaje del área de pico total (véase la Tabla 15).

Tabla 15: Porcentaje de agregación para formulaciones de la Tabla 13:

Nº de formulación	Tratamiento	0 semanas Inicial	4 semanas a 40 °C	8 semanas a 40 °C	12 semanas a 40 °C	24 semanas a 40 °C
35	+ aire en el espacio de cabeza	0,7 %	0,9 %	1,3 %	1,5 %	3,9 %
36	+ nitrógeno en el espacio de cabeza	0,7 %	0,6 %	0,7 %	1 %	1,5 %
37	+ aire en el espacio de cabeza + EDTA	0,7 %	0,6 %	0,8 %	0,9 %	1,5 %
38	+ nitrógeno en el espacio de cabeza + EDTA	0,7 %	0,6 %	0,6 %	0,8 %	1,1 %

Como puede verse en la Tabla 15, la formulación que contiene EDTA, la formulación de gas nitrógeno y la formulación de EDTA más gas nitrógeno mostraban menores niveles de agregación con el tiempo en comparación con una formulación sin EDTA y que tiene aire en el espacio de cabeza.

#### **Análisis de fragmentación:**

Se almacenaron las formulaciones de anticuerpo preparadas según la Tabla 13 a una temperatura de 40 °C. En las semanas 0, 4, 8, 12 y 24, se analizaron en cada formulación las impurezas hidrolíticas totales (concretamente, la fragmentación) usando PAGE-SDS reducido (PAGE-SDSr). Se muestrearon asépticamente los viales de formulación en cada punto temporal y se cargaron en geles de bis-Tris al 4-12 % de NuPAGE con tinte azul coloidal

(Coomassie). Se consiguió la reducción del gel mediante el uso del agente reductor NuPAGE®. Se estimó el porcentaje de impurezas (concretamente, la fragmentación) de cada banda sencilla en los geles reducidos mediante exploración con un densitómetro Molecular Dynamics Personal Densitometer PDQC-90 o densitómetro Bio-Rad GS800 Imaging Densitometer. Se calculó el nivel de fragmentación como el porcentaje del volumen de banda total (véase la Tabla 16).

Tabla 16: Porcentaje total de fragmentación (impurezas) para las formulaciones de la Tabla 13:

Nº de formulación	Tratamiento	0 semanas inicial	4 semanas a 40 °C	8 semanas a 40 °C	12 semanas a 40 °C	24 semanas a 40 °C
35	+ aire en el espacio de cabeza	1,3 %	4,1 %	5,5 %	8,0 %	12,4 %
36	+ nitrógeno en el espacio de cabeza	1,2 %	3,5 %	4,4 %	6,3 %	10,6 %
37	+ aire en el espacio de cabeza + EDTA	1,3 %	3,2 %	4,4 %	5,9 %	10,6 %
38	+ nitrógeno en el espacio de cabeza + EDTA	1,3 %	3,5 %	4,1 %	5,6 %	10,2 %

Como puede verse en la Tabla 16, la formulación que contiene EDTA, la formulación que contiene gas nitrógeno y la formulación de EDTA más gas nitrógeno mostraban menores niveles de fragmentación con el tiempo en comparación con la formulación sin EDTA y con aire en el espacio de cabeza.

#### **Formación de especies ácidas y básicas:**

Se almacenaron las formulaciones de anticuerpo preparadas según la Tabla 13 a una temperatura de 40 °C. En las semanas 0, 4, 12 y 24, se analizó en cada formulación la formación de especies ácidas y básicas usando imagenología por electroforesis capilar (iCE). Se realizó la imagenología por electroforesis capilar usando un analizador Convergent Biosciences iCE280 para la evaluación de la heterogeneidad de carga. El Convergent iCE280 es un instrumento de imagenología por enfoque isoeléctrico capilar (EIE) que permite al usuario tomar una imagen de una muestra separada contenida en un capilar.

Se muestrearon asépticamente los viales de formulación en cada punto temporal. Se prepararon entonces las muestras en una mezcla de anfólitos electroforéticos, metilcelulosa, marcadores de calibración y agua. Se introdujeron las muestras en el iCE280 y se aplicó un alto potencial/voltaje. Se realizaron los ensayos de EIE usando geles de poliacrilamida de pH 3-10,5 preparados manualmente usando tinción con azul de Coomassie. Se separaron los componentes proteicos de la muestra basándose en sus puntos isoeléctricos (pI) relativos y su localización. Se observó la cantidad relativa de cada componente separado mediante una cámara de imagenología por CCD. Se procesaron entonces los datos y se reseñaron como pérdida del pico principal (concretamente, formación de especies ácidas y básicas) usando software de integración de cromatografía convencional (véase la Tabla 17).

Tabla 17: Pérdida del pico principal para las formulaciones de la Tabla 13:

Nº de formulación	Tratamiento	0 semanas inicial	4 semanas a 40 °C	8 semanas a 40 °C	12 semanas a 40 °C	24 semanas a 40 °C
35	+ aire en el espacio de cabeza	65,3	50,3	-	28,8	15,5
36	+ nitrógeno en el espacio de cabeza	63,8	52,2	-	33,1	22,7
37	+ aire en el espacio de cabeza + EDTA	62,3	55,4	-	37,0	23,4
38	+ nitrógeno en el espacio de cabeza + EDTA	63,9	56,6	-	40,0	24,8

Como puede verse en la Tabla 17, la formulación que contiene EDTA, la formulación de gas nitrógeno y la formulación de EDTA más gas nitrógeno mostraban mayores niveles de pico principal intacto con el tiempo en comparación con una formulación sin EDTA y que tiene aire en el espacio de cabeza. Por tanto, la cantidad de formación de especies ácidas y básicas es mayor con el tiempo en formulaciones que carecen de EDTA y/o gas nitrógeno en el espacio de cabeza.

**Análisis de oxidación de aminoácidos:**

Se midieron los niveles de oxidación de metionina en las posiciones aminoacídicas 256 y 432 del anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1 mediante un procedimiento de cartografía por Lys-C después de almacenamiento durante 12 semanas a 40 °C.

- 5 Se muestrearon aseptícamente los viales que contienen las formulaciones de la Tabla 13 en el punto temporal de 12 semanas. Se digirieron entonces las muestras con la enzima lisil endopeptidasa (LysC) en tampón tris a pH 8,0 en condiciones estándares, y se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa. Se logró la separación usando una columna analítica Grace Vydac Protein C4 con elución en gradiente de TFA al 0,1 % en agua y TFA al 0,085 % en acetonitrilo.
- 10 Tabla 18: Porcentaje de oxidación de los aminoácidos metionina en el anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1 en las formulaciones de la Tabla 13:

<u>Nº de formulación</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Residuo aminoacídico</u>	<u>Porcentaje de oxidación 0 semanas</u>	<u>Porcentaje de oxidación 12 semanas</u>
35	+ aire en el espacio de cabeza	Met-432	1,6 %	7,3 %
		Met-256	5 %	17,9 %
36	+ nitrógeno en el espacio de cabeza	Met-432	1,6 %	3,3 %
		Met-256	5 %	7,8 %
37	+ aire en el espacio de cabeza + EDTA	Met-432	1,6 %	3,9 %
		Met-256	5 %	9,7 %
38	+ nitrógeno en el espacio de cabeza + EDTA	Met-432	1,6 %	2,6 %
		Met-256	5 %	5,9 %

- Los resultados en la Tabla 18 indican que la adición de EDTA a la formulación del anticuerpo 11.2.1 y/o la adición de gas nitrógeno al espacio de cabeza del vial redujeron el porcentaje de oxidación en los dos residuos de metionina indicados en comparación con una formulación sin EDTA y que tiene aire en el espacio de cabeza.
- 15

**EJEMPLO 10**

Se realizó un estudio para comparar el efecto sobre la estabilidad de las formulaciones de anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1 que comprenden tampón de acetato de sodio y cloruro de sodio (concretamente, iones cloruro) frente a formulaciones que comprenden tampón de histidina y trehalosa.

- 20 Específicamente, se analizó el impacto sobre la estabilidad del anticuerpo 11.2.1 con respecto a decoloración, agregación y fragmentación.

Se enumeran en la Tabla 19 las formulaciones que se evaluaron. El procedimiento usado para preparar las formulaciones es el mismo que el descrito en el Ejemplo 3.

- 25 Se prepararon las formulaciones de la Tabla 19 tomando una solución madre 11,9 mg/ml de anticuerpo 11.2.1 en tampón de acetato de sodio 20 mM a pH 5,5, cloruro de sodio 140 mM, y sometándolo a una etapa de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) en un Millipore Lab Scale TFF System con membrana Pellicon XL PBTK 30K de 50 cm<sup>2</sup>. A continuación, se prepararon soluciones concentradas del anticuerpo 11.2.1 en el intervalo de 35 a 40 mg/ml en tampones de acetato de sodio 20 mM o histidina 20 mM.

- 30 Se prepararon concentrados del agente tonificante en tampones de acetato de sodio o histidina al triple de las concentraciones finales objetivo. Se preparó una solución concentrada de polisorbato 80 a 20 mg/ml y de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O 10 mg/ml en cada uno de los tampones. Se prepararon formulaciones individuales diluyendo las soluciones concentradas apropiadamente. Se filtraron entonces las formulaciones a través de filtros de grado esterilizante de 0,2 µm y rellenaron varios viales por duplicado. Se usó un volumen de relleno de 1 ml en viales de vidrio de tipo 1 de 2 ml. Se cerraron los viales con tapones recubiertos Daikyo 777-1 FluroteC®, se sellaron por engastado y se almacenaron verticalmente en cámaras de estabilidad a 25 y 40 °C. Se dispuso también otro conjunto de viales a -20 °C durante 4 semanas y se sometió otro conjunto a 4x ciclos de congelación/descongelación (caja de viales rellenos de agua) como se describe en el Ejemplo 4. Todas las formulaciones tenían un pH de 5,5 y una concentración de anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1 de 20 mg/ml.
- 35

- 40 Se analizaron inmediatamente en varios viales los niveles de decoloración, agregación y fragmentación y se almacenaron también verticalmente varios otros viales duplicados a 25 y 40 °C durante 4, 8, 12, 18, 24 y 36 semanas. En cada punto temporal, se retiraron dos viales almacenados por formulación de cada condición para medir el nivel de agregación y fragmentación del anticuerpo 11.2.1 y se observó también la decoloración. Las Tablas 20 a 24 y las Figuras 3 y 4 reseñan los resultados.

Tabla 19: Formulaciones de anticuerpo ensayadas:

Nº	Acetato (mM)	Histidina (mM)	Tween 80 (mg/ml)	Cloruro de sodio (mg/ml)	Manitol (mg/ml)	Trehalosa (mg/ml)	Glicina (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	PEG 3350 (mg/ml)	Metionina (mg/ml)
26	20	-	0,2	8,2	-	-	-	-	-	-
39	20	-	0,2	5,0	18	-	-	0,1	-	-
40	-	20	0,2	-	-	84	-	-	-	-
37	-	20	0,2	-	-	84	-	0,1	-	-
41	-	20	0,2	-	-	84	-	0,1	-	2
42	-	20	0,4	-	-	84	-	0,1	-	-
43	-	20	0,2	-	41	10	-	-	-	-
44	-	20	0,2	-	41	10	-	0,1	-	-

**Análisis de la apariencia de la formulación:**

- 5 Se evaluó visualmente cada formulación después de 1) mezclar inicialmente la formulación, 2) congelar la formulación a -20 °C durante 4 semanas y 3) después de 4 ciclos de congelación/descongelación (-70 a 5 °C en una caja junto con viales rellenos de agua como se describe en el Ejemplo 4). Se evaluaron visualmente en cada formulación después de 0 (inicial), 8, 12 y 24 semanas la formación de partículas, el cambio de color y el cambio de turbidez, y se reseñan en la Tabla 20 (congelación/descongelación), la Tabla 21 (almacenamiento a 25 °C) y la Tabla 22 (almacenamiento a 40 °C).

Tabla 20: Evaluaciones visuales de formulaciones de la Tabla 19 después de congelación/descongelación:

Nº	Inicial	Después de descongelación a -20 °C durante 4 semanas	Después de 4 ciclos de congelación/descongelación
26	Transparente, incoloro, sin partículas	Muy ligeramente opaco, más de 3 partículas	Muy ligeramente opaco, muchas partículas
39	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas
40	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas
37	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas
41	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas
42	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas
43	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas
44	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas	Transparente, incoloro, sin partículas

10 Tabla 21. Evaluaciones visuales de las formulaciones de la Tabla 19 después de almacenamiento a 25 °C:

Nº	Inicial	8 semanas a 25 °C	12 semanas a 25 °C	24 semanas a 25 °C
26	Transparente, incoloro, sin partículas	Muy ligeramente opaco, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas
39	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas	-
40	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas
37	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas
41	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas
42	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas
43	Transparente, incoloro, sin partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas
44	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Muy ligeramente opaco, sin partículas

Tabla 22: Evaluaciones visuales de las formulaciones de la Tabla 19 después de almacenamiento a 40 °C:

Nº	Inicial	8 semanas a 40 °C	12 semanas a 40 °C	24 semanas a 40 °C
26	Transparente, incoloro, sin partículas	Muy ligeramente opaco, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Ligeramente rosa, sin partículas
39	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	-
40	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Ligeramente rosa, sin partículas
37	Transparente, incoloro, sin partículas			
41	Transparente, incoloro, sin partículas			
42	Transparente, incoloro, sin partículas			

	sin partículas	sin partículas	sin partículas	sin partículas
43	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Ligeramente rosa, sin partículas
44	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Muy ligeramente opaco, sin partículas

Los resultados de la Tablas 20 a 22 indican que las formulaciones de anticuerpo 11.2.1 que contienen EDTA tenían una decoloración reducida, turbidez reducida y formación de partículas reducida en comparación con esas formulaciones sin EDTA. Globalmente, las formulaciones que contienen cloruro de sodio tenían una decoloración, turbidez y formación de partículas aumentadas en comparación con formulaciones que tienen EDTA pero sin cloruro de sodio.

**Análisis de agregación:**

Se almacenaron las formulaciones de anticuerpo preparadas según la Tabla 19 a una temperatura de 25 y 40 °C. En las semanas 0 (inicial), 4, 8, 12, 24 y 36 semanas, se analizó en las formulaciones a 25 °C la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño. En las semanas 4, 8, 12 y 24 semanas, se analizó en las formulaciones a 40 °C la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño. Se muestrearon asépticamente los viales de formulación en cada punto temporal. Se llevó a cabo la cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras usando una columna TSK gel G3000SWXL-G2000SWXL, fase móvil tampón de fosfato de sodio 0,2 M a pH 7,0, caudal de 1 ml/min y detección UV a 214 nm. Las Tablas 23(a) y 23(b) muestran el porcentaje de agregación del anticuerpo 11.2.1 medido en los momentos relevantes para cada uno de los tratamientos de formulación. Se calcularon los niveles de agregación integrando las áreas bajo los picos de cromatograma para cada formulación y reseñando las áreas integradas bajo los picos de especies de alto peso molecular como porcentaje del área de pico total (véanse las Tablas 23(a) y 23(b)).

Tabla 23(a): Porcentaje de agregación para las formulaciones de la Tabla 19 después de almacenamiento a 25 °C:

Nº	Inicial	4 semanas a 25 °C	8 semanas a 25 °C	12 semanas a 25 °C	18 semanas a 25 °C	24 semanas a 25 °C	36 semanas a 25 °C
26	0,7 %	0,9 %	0,9 %	1,1 %	1,8 %	1,8 %	3,0 %
39	0,7 %	0,8 %	0,8 %	1,1 %	-	-	-
40	0,6 %	0,6 %	0,7 %	0,9 %	0,95 %	0,8 %	0,9 %
37	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,7 %	0,7 %	0,7%	0,8 %
41	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,7 %	0,7 %	0,7%	0,7 %
42	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,8 %	0,8 %	0,8 %	0,8 %
43	0,6 %	0,6 %	-	-	0,7 %	0,8 %	0,9 %
44	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,7 %	0,7 %	0,8 %	0,8 %

La Tabla 23(b) siguiente reseña los datos de agregación que se presentan gráficamente en la Figura 3.

Tabla 23(b): Porcentaje de agregación de las formulaciones de la Tabla 19 después de almacenamiento a 40 °C:

Nº	Inicial	4 semanas a 40 °C	8 semanas a 40 °C	12 semanas a 40 °C	24 semanas a 40 °C
26	0,7 %	1,0 %	1,3 %	2,8 %	4,7 %
39	0,6 %	1,0 %	1,0 %	1,4 %	-
40	0,6 %	0,7 %	0,9 %	1,0 %	1,4 %
37	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,8 %	1,1 %
41	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,7 %	0,8 %
42	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,8 %	1,1 %
43	0,6 %	0,8 %	-	-	1,7 %
44	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,8 %	0,9 %

Como puede verse en las Tablas 23(a), 23(b) y la Figura 3, las formulaciones que contienen EDTA mostraban niveles reducidos de agregación en comparación con una formulación que carece de EDTA, pero que tiene un tampón de acetato y cloruro de sodio, después de almacenamiento a 25 y 40 °C. Además, una formulación que contiene un tampón de histidina (sin EDTA) tenía una cantidad reducida de agregación en comparación con una formulación que carece de EDTA pero que contiene un tampón de acetato y cloruro de sodio.

**Análisis de fragmentación:**

Se almacenaron a una temperatura de 25 y 40 °C las formulaciones de anticuerpo preparadas según la Tabla 19. En las semanas 0 (inicial), 4, 8, 12, 18 y 36 semanas, se analizaron en cada formulación las impurezas hidrolíticas totales (concretamente, la fragmentación) usando PAGE-SDS reducido (PAGE-SDSr). Se muestrearon

- asépticamente los viales de formulación en cada punto temporal y se cargaron en geles bisTris al 4-12 % de NuPAGE con tinción con azul coloidal (Coomasie). Se consiguió la reducción del gel mediante el uso del agente reductor NuPAGE®. Se estimó el porcentaje de impurezas (concretamente, la fragmentación) de cada banda sencilla en los geles reducidos por exploración con un densitómetro Molecular Dynamics Personal Densitometer PDQC-90 o densitómetro Bio-Rad GS800 Imaging Densitometer. Se calculó el nivel de fragmentación como un porcentaje del volumen de banda total (véanse las Tablas 24(a) y 24(b)).

Tabla 24(a): Porcentaje de fragmentación de las formulaciones de la Tabla 19 después de almacenamiento a 25 °C:

Nº	Inicial	4 semanas a 25 °C	8 semanas a 25 °C	12 semanas a 25 °C	18 semanas a 25 °C	24 semanas a 25 °C	36 semanas a 25 °C
26	1,8 %	1,6 %	2,6 %	2,4 %	1,3 %	3,5 %	3,7 %
39	1,6 %	1,4 %	2,4 %	1,5 %	-	-	-
40	1,6 %	1,7 %	2,6 %	1,4 %	1,4 %	3,3 %	3,2 %
37	1,6 %	1,6 %	2,5 %	1,4 %	1,4 %	3,3 %	3,1 %
41	1,6 %	1,6 %	2,6 %	1,4 %	1,2 %	3,3 %	2,9 %
42	1,9 %	1,8 %	2,5 %	1,6 %	1,2 %	3,0 %	2,9 %
43	1,8 %	1,8 %	-	-	1,2 %	3,2 %	3,1 %
44	1,7 %	1,7 %	2,6 %	1,4 %	1,3 %	3,1 %	2,8 %

La Tabla 24(b) siguiente reseña los datos que se presentan gráficamente en la Figura 4.

- Tabla 24(b): Porcentaje de fragmentación para las formulaciones de la Tabla 19 después de almacenamiento a 40 °C:

Nº	Inicial	4 semanas a 40 °C	8 semanas a 40 °C	12 semanas a 40 °C	24 semanas a 40 °C
26	1,8 %	5,2 %	6,1 %	7,8 %	11,7 %
39	1,6 %	5,3 %	6,7 %	6,5 %	-
40	1,6 %	5,3 %	6,8 %	6,2 %	10,0 %
37	1,6 %	5,2 %	6,6 %	5,5 %	10,2 %
41	1,6 %	5,2 %	5,0 %	5,5 %	10,0 %
42	1,9 %	5,3 %	5,1 %	5,8 %	9,7 %
43	1,8 %	5,3 %	-	-	11,0 %
44	1,7 %	4,5 %	5,2 %	5,5 %	9,5 %

- Como puede verse en las Tablas 24(a), 24(b) y la Figura 4, las formulaciones que contienen EDTA mostraban niveles reducidos de fragmentación en comparación con una formulación que carece de EDTA, pero que tiene un tampón de acetato y cloruro de sodio, después de almacenamiento a 25 y 40 °C.

#### EJEMPLO 11

- Se realizó un estudio para comparar el efecto de concentraciones variables de EDTA sobre la estabilidad de formulaciones del anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1. Se ensayaron también alternativas a una formulación de trehalosa con tampón de histidina, reemplazando parte de la trehalosa por manitol.
- Específicamente, se analizó el impacto sobre la estabilidad del anticuerpo 11.2.1 con respecto a decoloración, agregación, fragmentación y oxidación.
- Se enumeran en la Tabla 25 siguiente las formulaciones que se evaluaron. El procedimiento usado para preparar las formulaciones es el mismo que el descrito en el Ejemplo 10.
- Se prepararon las formulaciones de la Tabla 25 tomando una solución madre 11,9 mg/ml de anticuerpo 11.2.1 en tampón de acetato de sodio 20 mM a pH 5,5, cloruro de sodio 140 mM, y sometándolo a una etapa de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) en un Millipore Lab Scale TFF System con una membrana Pellicon XL PBTK 30K de 50 cm<sup>2</sup>. A continuación, se prepararon soluciones concentradas del anticuerpo 11.2.1 en el intervalo de 35 a 40 mg/ml en tampones de acetato de sodio 20 mM o histidina 20 mM.
- Se prepararon concentrados del agente tonificante en el tampón de acetato de sodio o histidina al triple de las concentraciones finales objetivo. Se preparó una solución concentrada de polisorbato 80 20 mg/ml y de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O 10 mg/ml en cada uno de los tampones. Se prepararon formulaciones individuales diluyendo las soluciones concentradas apropiadamente. Se examinaron las concentraciones de EDTA (como Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O) en el intervalo de 0-0,1 mg/ml. Se filtraron entonces las formulaciones a través de filtros de grado esterilizante de 0,2 µm y se rellenaron varios viales por duplicado. Se usó un volumen de relleno de 1 ml en viales de vidrio de tipo 1 de 2 ml.

Se cerraron los viales con tapones recubiertos Daikyo 777-1 FluroteC®, se sellaron por engastado y se almacenaron verticalmente en cámaras de estabilidad a 25 y 40 °C. Se sometió otro conjunto de viales a 4x ciclos de congelación/descongelación como se describe en el Ejemplo 10. Todas las formulaciones tenían un pH de 5,5 y una concentración del anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1 de 20 mg/ml.

5 Se analizaron inmediatamente en varios viales los niveles de decoloración, agregación, fragmentación y oxidación y se almacenaron también varios otros viales por duplicado verticalmente a 25 y 40 °C durante 4, 8, 13, 18 y 24 semanas. En cada punto temporal, se retiraron dos viales almacenados por formulación de cada condición para medir el nivel de agregación y fragmentación del anticuerpo 11.2.1 y se observó la decoloración también. Las Tablas 26 a 31 y las Figuras 5 a 10 reseñan los resultados.

10 Tabla 25: Formulaciones de anticuerpo ensayadas:

Nº	Acetato (mM)	Histidina (mM)	Tween 80 (mg/ml)	Manitol (mg/ml)	Trehalosa (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	Cloruro de sodio (mg/ml)
26	20	-	0,2	-	-	-	8,4
40	-	20	0,2	-	84	-	-
45	-	20	0,2	-	84	0,001	-
46	-	20	0,2	-	84	0,005	-
47	-	20	0,2	-	84	0,01	-
48	-	20	0,2	-	84	0,05	-
37	-	20	0,2	-	84	0,1	-
49	-	20	0,2	10	70	0,001	-
50	-	20	0,04	10	70	0,01	-
51	-	20	0,2	10	70	0,1	-
52	-	20	0,2	20	50	0,001	-
53	-	20	0,2	20	50	0,01	-
54	-	20	0,2	20	50	0,1	-

**Análisis de la apariencia de la formulación:**

Se evaluó visualmente cada formulación después de 1) mezclar inicialmente la formulación, 2) después de 4 ciclos de congelación/descongelación y 3) después de almacenamiento a 25 y 40 °C durante 4, 8, 13, 18 y 24 semanas. Se evaluaron en las formulaciones la formación de partículas, los cambios de color y los cambios de turbidez y se reseñaron en las Tablas 26 a 28.

15

ES 2 707 284 T3

Tabla 26: Evaluaciones visuales de las formulaciones de la Tabla 25 después de congelación/descongelación:

<b>Nº de formulación</b>	<b>Inicial</b>	<b>Después de 4x ciclos de congelación/descongelación</b>
26	Transparente, incoloro, sin partículas	Muy ligeramente opaco, sin particular
40	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas
45	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas
46	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas
47	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas
48	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, más de 3 partículas
37	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas
49	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, más de 3 partículas
50	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas
51	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas
52	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas
53	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas
54	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas

Tabla 27: Evaluaciones visuales de las formulaciones de la Tabla 25 después de almacenamiento a 25 °C:

<b>Nº</b>	<b>Inicial</b>	<b>13 semanas a 25 °C</b>	<b>18 semanas a 25 °C</b>	<b>24 semanas a 25 °C</b>
26	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Muy ligeramente rosa, sin partículas	
40	Transparente, incoloro, sin partículas	Muy ligeramente rosa, sin partículas	-	Transparente, Y6*, sin partículas
45	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas
46	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas
47	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas
48	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas
37	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas
49	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas
50	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas
51	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas
52	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas
53	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas
54	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas

\*Y6 e Y4 son anotaciones de escala de color en la escala de amarillo EP, siendo Y6 menos amarillo que Y4. (Ref: Ph. Eur 5.0, 2005 Monograph 2.2.2).

Tabla 28: Evaluaciones visuales de las formulaciones de la Tabla 25 después de almacenamiento a 40 °C:

Nº	Inicial	8 semanas a 40 °C	13 semanas a 40 °C	18 semanas a 40 °C	24 semanas a 40 °C
26	Transparente, incoloro, sin partículas	Muy ligeramente rosa, sin partículas	Muy ligeramente rosa, sin partículas	Rosa, sin partículas	Rosa, sin partículas
40	Transparente, incoloro, sin partículas	Muy ligeramente rosa, sin partículas	Muy ligeramente rosa, sin partículas	-	Transparente, Y4*, sin partículas
45	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas
46	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas
47	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas
48	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas
37	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas
49	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas
50	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas
51	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas
52	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas
53	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas
54	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, sin partículas	Transparente, incoloro, menos de 3 partículas	-	Transparente, incoloro, sin partículas

\*Y6 e Y4 son anotaciones de escala de color en la escala de amarillo EP, siendo Y6 menos amarillo que Y4. (Ref: Ph. Eur 5.0, 2005 Monograph 2.2.2).

- 5 Los resultados en las Tablas 26 a 28 indican que las formulaciones de anticuerpo 11.2.1 que contienen todas las concentraciones de EDTA ensayadas tenían decoloración reducida, turbidez reducida y formación de partículas reducida en comparación con esas formulaciones sin EDTA.

Globalmente, las formulaciones que contienen cloruro de sodio tenían una protección ante congelación/descongelación reducida como se evidencia por la decoloración, turbidez y formación de partículas aumentadas en comparación con formulaciones que tienen EDTA pero sin cloruro de sodio.

#### 10 **Análisis de agregación:**

- Se almacenaron a una temperatura de 25 y 40 °C las formulaciones de anticuerpo preparadas según la Tabla 25. En las semanas 0 (inicial), 4, 8, 13, 18 y 24, se analizó en las formulaciones a 25 y 40 °C la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño. Se muestrearon asepticamente los viales de formulación en cada punto temporal. Se llevó a cabo la cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras usando una columna TSK gel G3000SWXL-G2000SWXL, fase móvil tampón de fosfato de sodio 0,2 M a pH 7,0, caudal de 1 ml/min y detección UV a 214 nm. La Tabla 29(a) muestra el porcentaje de agregación del anticuerpo 11.2.1 medido después de almacenamiento a 25 °C en los momentos relevantes para cada una de las formulaciones. La Tabla 29(b) muestra el porcentaje de agregación del anticuerpo 11.2.1 medido después de almacenamiento a 40 °C. Se calcularon los niveles de agregación integrando las áreas bajo los picos de cromatograma para cada formulación y reseñando las

áreas integradas bajo los picos de especies de alto peso molecular como porcentaje del área de pico total (véanse las Tablas 29(a) y 29(b)).

Tabla 29(a): Porcentaje de agregación para las formulaciones de la Tabla 25 después de almacenamiento a 25 °C:

Nº	Inicial	4 semanas a 25 °C	8 semanas a 25 °C	13 semanas a 25 °C	18 semanas a 25 °C	24 semanas a 25 °C
26	0,8 %	-	-	1,1 %	1,6 %	-
40	0,7 %	-	-	0,7 %	0,8 %	0,8 %
45	0,7 %	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,7 %	0,7 %
46	0,7 %	-	-	0,6 %	0,7 %	0,7 %
47	0,7 %	0,7 %	0,6 %	0,6 %	0,7 %	0,7 %
48	0,7 %			0,6 %	0,7 %	0,7 %
37	0,7 %	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,7 %	0,7 %
49	0,7 %	-	-	0,6 %	-	-
50	0,7 %	-	-	0,6 %	-	-
51	0,7 %	-	-	0,6 %	-	0,7 %
52	0,7 %	0,6 %	0,6 %	0,6 %	-	-
53	0,7 %	0,6 %	0,6 %	0,6 %	-	0,7 %
54	0,7 %	0,6 %	0,6 %	0,6 %	-	-

- 5 La Tabla 29(b) siguiente reseña los datos de agregación que se presentan gráficamente en la Figura 5.

Tabla 29(b): Porcentaje de agregación para las formulaciones de la Tabla 25 después de almacenamiento a 40 °C:

Nº	Inicial	4 semanas a 40 °C	8 semanas a 40 °C	13 semanas a 40 °C	18 semanas a 40 °C	24 semanas a 40 °C
26	0,8 %	-	3,1 %	4,3 %	5,2 %	-
40	0,7 %	-	0,9 %	1,2 %	1,8 %	2,7 %
45	0,7 %	0,6 %	0,8 %	0,8 %	1,0 %	1,4 %
46	0,7 %	-	0,7 %	0,8 %	1,0 %	1,3 %
47	0,7 %	0,6 %	0,7 %	0,8 %	0,8 %	1,1 %
48	0,7 %	-	0,7 %	0,8 %	0,9 %	1,3 %
37	0,7 %	0,7 %	0,7 %	0,8 %	1,0 %	1,1 %
49	0,7 %	-	0,8 %	0,8 %	-	-
50	0,7 %	-	0,7 %	0,8 %	-	-
51	0,7 %	-	0,8 %	0,8 %	-	1,2 %
52	0,7 %	0,6 %	0,7 %	0,8 %	-	-
53	0,7 %	0,7 %	0,7 %	0,7 %	-	1,2 %
54	0,7 %	0,6 %	0,8 %	0,7 %	-	-

- 10 Como puede verse en las Tablas 29(a), 29(b) y la Figura 5, las formulaciones que contienen EDTA mostraban niveles reducidos de agregación a todas las concentraciones de EDTA ensayadas, en comparación con una formulación que carece de EDTA pero que tiene un tampón de acetato y cloruro de sodio después de almacenamiento a 25 y 40 °C. La Figura 7 resume gráficamente la reducción del porcentaje de agregación para las formulaciones de la Tabla 25 en función de la concentración de EDTA.

#### **Análisis de fragmentación:**

- 15 Se almacenaron las formulaciones de anticuerpo preparadas según la Tabla 25 a una temperatura de 25 y 40 °C. En las semanas 0 (inicial), 4, 8, 13, 18 y 24, se analizaron en las formulaciones a 25 y 40 °C las impurezas hidrolíticas totales (concretamente, la fragmentación) usando PAGE-SDS reducida (PAGE-SDSr). Se muestrearon aseptícamente los viales de formulación en cada punto temporal y se cargaron en geles de bis-tris al 4-12 % de NuPAGE con tinción con azul coloidal (Coomassie). Se consiguió la reducción del gel mediante el uso del agente reductor NuPAGE®. Se estimó el porcentaje de impurezas (concretamente, la fragmentación) de cada banda de muestra en los geles reducidos mediante exploración con un densitómetro Molecular Dynamics Personal Densitometer PDQC-90 o densitómetro Bio-Rad GS800 Imaging Densitometer. Se calculó el nivel de fragmentación como porcentaje del volumen de banda total (véanse las Tablas 30(a) y 30(b)).
- 20

Tabla 30(a): Porcentaje de fragmentación para las formulaciones de la Tabla 25 después de almacenamiento a 25 °C:

Nº	Inicial	4 semanas a 25 °C	8 semanas a 25 °C	13 semanas a 25 °C	18 semanas a 25 °C	24 semanas a 25 °C
26	1,3 %	-	-	3,3 %	3,7 %	-
40	1,1 %	-	-	2,6 %	3,1 %	3,1 %
45	1,5 %	2,7 %	2,3 %	3,1 %	3,0 %	3,4 %
46	1,0 %	-	-	2,5 %	3,1 %	2,9 %
47	2,5 %	2,5 %	2,3 %	3,1 %	3,0 %	3,3 %
48	3,1 %	-	-	2,5 %	3,2 %	2,9 %
37	3,6 %	2,6 %	2,3 %	3,1 %	3,0 %	3,3 %
49	1,0 %	-	-	2,6 %	-	-
50	1,1 %	-	-	2,7 %	-	-
51	1,2 %	-	-	2,7 %	-	2,9 %
52	2,4 %	2,7 %	2,3 %	3,1 %	-	-
53	1,6 %	2,4 %	2,3 %	2,9 %	-	3,4 %
54	1,6 %	2,7 %	2,2 %	3,2 %	-	-

La Tabla 30(b) siguiente reseña los datos de fragmentación que se presentan gráficamente en la Figura 6.

5 Tabla 30(b): Porcentaje de fragmentación para las formulaciones de la Tabla 25 después de almacenamiento a 40 °C:

Nº	Inicial	4 semanas a 40 °C	8 semanas a 40 °C	13 semanas a 40 °C	18 semanas a 40 °C	24 semanas a 40 °C
26	-	-	6,2 %	7,3 %	8,7 %	10,1 %
40	-	-	3,9 %	6,9 %	8,2 %	7,2 %
45	-	2,9 %	4,3 %	4,2 %	6,7 %	6,7 %
46	-	-	4,1 %	5,6 %	7,1 %	6,1 %
47	-	1,9 %	2,8 %	3,4 %	5,4 %	5,6 %
48	-	-	2,0 %	4,2 %	5,0 %	4,0 %
37	-	0,7 %	1,5 %	2,2 %	5,0 %	4,5 %
49	-	-	4,1 %	5,8 %	-	-
50	-	-	3,7 %	5,5 %	-	-
51	-	-	3,7 %	5,5 %	-	5,4 %
52	-	1,8 %	2,4 %	3,1 %	-	-
53	-	2,4 %	3,3 %	4,1 %	-	6,6 %
54	-	2,3 %	3,1 %	3,8 %	-	-

10 Como puede verse en las Tablas 30(a), 30(b) y la Figura 6, las formulaciones que contienen EDTA mostraban niveles reducidos de fragmentación en comparación con una formulación que carece de EDTA, pero que tiene un tampón de acetato y cloruro de sodio, después de almacenamiento a 25 y 40 °C. Además, las formulaciones que contienen histidina y trehalosa sin EDTA mostraban una fragmentación reducida frente a la formulación que contiene cloruro de sodio sin EDTA.

La Figura 8 resume gráficamente la reducción del porcentaje de fragmentación para las formulaciones de la Tabla 25 en función de la concentración de EDTA.

#### 15 **Análisis de oxidación de aminoácidos:**

20 Se midieron los niveles de oxidación de ciertos residuos de metionina en las posiciones aminoacídicas 256 y 432 en el anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1 mediante un procedimiento de cartografía por Lys-C. Se muestrearon asepticamente los viales que contienen las formulaciones de la Tabla 25 en los puntos temporales de la semana 18 y la semana 24 después de almacenamiento a 40 °C. Se digirieron entonces las muestras con la enzima lisil endopeptidasa (Lys-C) en tampón tris a pH 8,0 en condiciones estándares y se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa. Se logró la separación usando una columna analítica Grace Vydac Protein C4 con elución en gradiente de TFA al 0,1 % en agua y TFA al 0,085 % en acetonitrilo. La Tabla 31 reseña los resultados.

Tabla 31: Porcentaje de oxidación de aminoácidos metionina en el anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1 en las formulaciones de la Tabla 25:

Nº	Residuo aminoacídico	Inicial	18 semanas	24 semanas
26	Met 432	1,6 %	5,5 %	6,9 %
	Met 256	5 %	12,8 %	13,6 %
40	Met 432	1,6 %	5,6 %	8,8 %
	Met 256	5 %	14,0 %	16,1 %
45	Met 432	1,6 %	4,8 %	6,2 %
	Met 256	5 %	11,6 %	12,8 %
46	Met 432	1,6 %	3,5 %	6,1 %
	Met 256	5 %	8,8 %	12,5 %
47	Met 432	1,6 %	3,4 %	4,2 %
	Met 256	5 %	8,4 %	8,3 %
48	Met 432	1,6 %	2,8 %	5,7 %
	Met 256	5 %	7,6 %	12,6 %
37	Met 432	1,6 %	4,5 %	4,7 %
	Met 256	5 %	11,0 %	9,4 %

5 Como puede verse en la Tabla 31, la presencia de EDTA en la formulación del anticuerpo 11.2.1 reduce el nivel de oxidación de metionina que aparece con el tiempo.

#### EJEMPLO 12

10 Se realizó un estudio para comparar el efecto de manitol y sorbitol sobre la estabilidad de formulaciones del anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1. En este ejemplo, se ensayaron alternativas a una formulación de histidina-trehalosa, reemplazando parte de la trehalosa por concentraciones variables de manitol y/o sorbitol (Tabla 32). Se examinaron concentraciones de EDTA (como Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O) en el intervalo de 0 a 0,1 mg/ml.

Específicamente, se analizó el impacto sobre la estabilidad del anticuerpo 11.2.1 con respecto a decoloración, agregación, fragmentación y oxidación.

Se enumeran en la Tabla 32 siguiente las formulaciones que se evaluaron. El procedimiento usado para preparar las formulaciones es el mismo que el descrito en el Ejemplo 10.

15 Se prepararon las formulaciones de la Tabla 32 tomando una solución madre 11,9 mg/ml del anticuerpo 11.2.1 en tampón de acetato de sodio 20 mM a pH 5,5, cloruro de sodio 140 mM, y sometiéndola a una etapa de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) en un Millipore Lab Scale TFF System con una membrana Pellicon XL PBTK 30K de 50 cm<sup>2</sup>. A continuación, se prepararon soluciones concentradas del anticuerpo 11.2.1 en el intervalo de 35 a 40 mg/ml en tampones de acetato de sodio 20 mM o histidina 20 mM.

20 Se prepararon concentrados del agente tonificante en el tampón de acetato de sodio o histidina al triple de las concentraciones finales objetivo. Se preparó una solución concentrada de polisorbato 80 20 mg/ml y de Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 10 mg/ml en cada uno de los tampones. Se prepararon formulaciones individuales diluyendo la solución concentrada apropiadamente. Se filtraron entonces las formulaciones a través de filtros de grado esterilizante de 0,2 µm y se rellenaron varios viales por duplicado. Se usó un volumen de relleno de 1 ml en viales de vidrio de tipo 1 de 2 ml.

Se cerraron los viales con tapones recubiertos Daikyo 777-1 FluroteC®, se sellaron por engastado y se almacenaron verticalmente en cámaras de estabilidad a 25 y 40 °C. Se sometió otro conjunto de viales a 4x ciclos de congelación/descongelación como se describe en el Ejemplo 10. Todas las formulaciones tenían un pH de 5,5 y una concentración del anticuerpo anti-CTLA-4 11.2.1 de 20 mg/ml.

30 Se analizaron inmediatamente en varios viales los niveles de decoloración, agregación, fragmentación y oxidación y se almacenaron también varios otros viales por duplicado verticalmente a 25 y 40 °C durante 4, 8, 13, 18 y 24 semanas. En cada punto temporal, se retiraron dos viales almacenados por formulación de cada condición para medir el nivel de agregación y fragmentación del anticuerpo 11.2.1, y se observó la decoloración también. Las Tablas 33 a 37 y las Figuras 10 a 11 reseñan los resultados.

35 Tabla 32: Formulaciones de anticuerpo ensayadas:

Nº	Acetato de sodio (mM)	Histidina (mM)	Tween 80 (mg/ml)	Manitol (mg/ml)	Sorbitol (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	Cloruro de sodio (mg/ml)
26	20	-	0,2	-	-	-	8,4
55	-	20	0,2	-	45	0,001	-
56	-	20	0,2	-	45	0,01	-

Nº	Acetato de sodio (mM)	Histidina (mM)	Tween 80 (mg/ml)	Manitol (mg/ml)	Sorbitol (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	Cloruro de sodio (mg/ml)
57	-	20	0,2	-	45	0,1	-
58	-	20	0,2	5	40	0,001	-
59		20	0,2	5	40	0,01	-
60	-	20	0,2	5	40	0,1	-
61	-	20	0,2	15	30	0,001	-
62	-	20	0,2	15	30	0,01	-
63	-	20	0,2	15	30	0,1	-

**Análisis de la apariencia de la formulación:**

5 Se evaluó visualmente cada formulación después de 1) mezclar inicialmente la formulación, 2) después de 4 ciclos de congelación/descongelación (-70 a 5°C junto con los viales rellenos de agua en la caja del Ejemplo 4) y 3) después de almacenamiento a 25 y 40 °C durante 8, 13 y 24 semanas. Se evaluaron en las formulaciones la formación de partículas, los cambios de color y los cambios de turbidez y se reseñaron en las Tablas 33 a 35.

Tabla 33: Evaluaciones visuales de las formulaciones de la Tabla 32 después de congelación/descongelación:

Nº	Inicial	4x ciclos de congelación/descongelación
26	Transparente incoloro, sin partículas	Muy ligeramente opaco, sin partículas
55	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas
56	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas
57	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas
58	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas
59	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas
60	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas
61	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas
62	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas
63	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas

Tabla 34: Evaluaciones visuales de las formulaciones de la Tabla 32 después de almacenamiento a 25 °C:

Nº	Inicial	13 semanas a 25 °C	24 semanas a 25 °C
26	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	-
55	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas	Transparente incoloro, sin partículas
56	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas	Transparente incoloro, sin partículas
57	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas	Transparente incoloro, sin partículas
58	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas
59	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas
60	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas
61	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas
62	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas
63	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas

10

Tabla 35: Evaluaciones visuales de las formulaciones de la Tabla 25 después de almacenamiento a 40 °C:

Nº	Inicial	8 semanas a 40 °C	13 semanas a 40 °C	24 semanas a 40 °C
26	Transparente incoloro, sin partículas	Muy ligeramente rosa, sin partículas	Muy ligeramente rosa, sin partículas	Rosa, sin partículas
55	Transparente incoloro, sin partículas			

56	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas
57	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas	Transparente incoloro, sin partículas
58	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas	Transparente incoloro, sin partículas
59	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas
60	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas
61	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas	Transparente incoloro, sin partículas
62	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, menos de 3 partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas
63	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas	Transparente incoloro, sin partículas

5 Los resultados de las Tablas 33 a 35 indican que las formulaciones del anticuerpo 11.2.1 que contienen cloruro de sodio, pero sin EDTA, tenían una protección ante congelación/descongelación reducida, como se evidencia por la decoloración, turbidez y formación de partículas reducidas en comparación con formulaciones que tienen EDTA pero sin cloruro de sodio. Los resultados indican también que las formulaciones del anticuerpo 11.2.1 que contienen todas las concentraciones de EDTA ensayadas tenían decoloración reducida, turbidez reducida y formación de partículas reducidas en comparación con formulaciones sin EDTA.

**Análisis de agregación:**

10 Se almacenaron a una temperatura de 25 y 40 °C las formulaciones de anticuerpo preparadas según la Tabla 32. En las semanas 0 (inicial), 4, 8, 13, 18 y 24, se analizó en las formulaciones a 25 y 40 °C la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño. Se muestrearon asepticamente los viales de formulación en cada punto temporal. Se llevó a cabo la cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras usando una columna TSK gel G3000SWXL-G2000SWXL, fase móvil tampón de fosfato de sodio 0,2 M a pH 7,0, caudal de 1,0 ml/min y detección UV a 214 nm. La Tabla 36(a) muestra el porcentaje de agregación del anticuerpo 11.2.1 medido después de almacenamiento a 25 °C en los momentos relevantes para cada una de las formulaciones. La Tabla 36(b) muestra el porcentaje de agregación del anticuerpo 11.2.1 medido después de almacenamiento a 40 °C. Se calcularon los niveles de agregación integrando las áreas bajo los picos de cromatograma para cada formulación y reseñando las áreas integradas bajo los picos de especies de alto peso molecular como porcentaje del área de pico total (véanse las Tablas 36(a) y 36(b)).

20 Tabla 36(a): Porcentaje de agregación para las formulaciones de la Tabla 32 después de almacenamiento a 25 °C:

Nº	Inicial	4 semanas a 25 °C	8 semanas a 25 °C	13 semanas a 25 °C	18 semanas a 25 °C	24 semanas a 25 °C
26	0,8 %	-	-	1,1 %	1,6 %	-
55	0,7 %	0,6 %	0,6 %	0,6 %	-	-
56	0,7 %	0,6 %	0,7 %	0,6 %	-	-
57	0,7 %	0,6 %	0,6 %	0,6 %	-	0,7 %
58	0,7 %	-	-	0,6 %	-	-
59	0,7 %	-	-	0,6 %	-	-
60	0,7 %	-	-	0,6 %	-	-
61	0,7 %	0,7 %	0,6 %	0,6 %	-	-
62	0,7 %	0,6 %	0,6 %	0,6 %	-	-
63	0,7 %	0,6 %	0,8 %	0,6 %	-	-

La Tabla 36(b) siguiente reseña los datos de agregación que se presentan gráficamente en la Figura 9.

Tabla 36(b): Porcentaje de agregación para las formulaciones de la Tabla 32 después de almacenamiento a 40 °C:

Nº	Inicial	4 semanas a 40 °C	8 semanas a 40 °C	13 semanas a 40 °C	18 semanas a 40 °C	24 semanas a 40 °C
26	0,8 %	3,1 %	4,3 %	5,2 %	6,4 %	-
55	0,6 %	0,7 %	0,8 %	0,8 %	-	-
56	0,6 %	0,7 %	0,8 %	0,7 %	-	-
57	0,7 %	0,7 %	0,8 %	0,8 %	-	1,2 %
58	0,7 %	-	0,8 %	0,8 %	-	-

59	0,7 %	-	0,8 %	0,8 %	-	-
60	0,6 %	-	0,7 %	0,8 %	-	-
61	0,7 %	0,7 %	0,7 %	0,8 %	-	-
62	0,6 %	0,7 %	0,8 %	0,8 %	-	-
63	0,7 %	0,7 %	0,7 %	0,6 %	-	-

5 Como puede verse en las Tablas 36(a), 36(b) y la Figura 9, las formulaciones que contienen EDTA mostraban niveles reducidos de agregación a todas las concentraciones de EDTA ensayadas en comparación con una formulación que carece de EDTA, pero que tiene un tampón de acetato y cloruro de sodio (concretamente, iones cloruro), después de almacenamiento a 25 y 40 °C. La Figura 9 resume gráficamente la reducción del porcentaje de agregación para las formulaciones de la Tabla 32.

**Análisis de fragmentación:**

10 Se almacenaron a una temperatura de 25 y 40 °C las formulaciones de anticuerpo preparadas según la Tabla 32. En las semanas 0 (inicial), 4, 8, 13, 18 y 24, se analizaron en las formulaciones a 25 y 40 °C las impurezas hidrolíticas totales (concretamente, la fragmentación) usando PAGE-SDS reducido (PAGE-SDSr). Se muestrearon asépticamente los viales de formulación en cada punto temporal y se cargaron en geles bis-Tris al 4-12 % de NuPAGE con tinción con azul coloidal (Coomassie). Se consiguió la reducción del gel mediante el uso del agente reductor NuPAGE®. Se estimó el porcentaje de impurezas (concretamente, la fragmentación) de cada banda de muestra en los geles reducidos mediante exploración con el densitómetro Molecular Dynamics Personal Densitometer PDQC-90 o densitómetro Bio-Rad GS800 Imaging Densitometer. Se calculó el nivel de fragmentación como porcentaje del volumen de banda total (véanse las Tablas 37(a) y 37(b)).

15 Tabla 37(a): Porcentaje de fragmentación para las formulaciones de la Tabla 32 después de almacenamiento a 25 °C:

Nº	Inicial	4 semanas a 25 °C	8 semanas a 25 °C	13 semanas a 25 °C	18 semanas a 25 °C	24 semanas a 25 °C
26	1,3 %	-	-	3,3 %	3,7 %	-
55	1,6 %	-	-	2,9 %	-	-
56	1,6 %	-	-	2,5 %	-	-
57	1,6 %	-	-	2,4 %	-	2,9 %
58	1,0 %	-	-	2,5 %	-	-
59	1,1 %	-	-	2,6 %	-	-
60	1,2 %	-	-	2,6 %	-	-
61	1,1 %	-	-	2,5 %	-	-
62	1,0 %	-	-	2,5 %	-	-
63	1,1 %	2,3 %	2,1 %	2,6 %	-	-

20 La Tabla 37(b) siguiente reseña los datos de fragmentación que se presentan gráficamente en la Figura 10.

Tabla 37(b): Porcentaje de fragmentación para las formulaciones de la Tabla 32 después de almacenamiento a 40 °C:

Nº	Inicial	4 semanas a 25 °C	8 semanas a 25 °C	13 semanas a 25 °C	18 semanas a 25 °C	24 semanas a 25 °C
26	-	-	6,2 %	7,3 %	8,7 %	10,1 %
55	-	1,6 %	2,3 %	5,7 %	-	-
56	-	1,9 %	2,3 %	4,8 %	-	-
57	-	2,0 %	2,6 %	4,7 %	-	5,3 %
58	-	-	3,7 %	5,6 %	-	-
59	-	-	3,6 %	5,7 %	-	-
60	-	-	3,5 %	5,3 %	-	-
61	-	2,5 %	3,3 %	5,5 %	-	-
62	-	2,6 %	3,6 %	5,9 %	-	-
63	-	2,6 %	3,6 %	5,3 %	-	-

25 Como puede verse en las Tablas 37(a), 37(b) y la Figura 10, la formulaciones que contienen EDTA mostraban niveles reducidos de fragmentación en comparación con una formulación que carece de EDTA, pero que tiene tampón de acetato y cloruro de sodio (concretamente, iones cloruro), después de almacenamiento a 25 y 40 °C.

EJEMPLO 13

Este ejemplo ilustra la producción de una composición farmacéutica líquida que contiene el anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab, monoclórhidrato de L-histidina monohidratado, ácido etilendiaminotetraacético de disodio dihidratado,  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada y polisorbato 80.

- 5 Se formó dicha composición farmacéutica líquida obteniendo los siguientes componentes: el anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab (disponible en la línea celular de hibridoma 11.2.1.4 depositada con el número de acceso a ATCC PTA-5169 según el Ejemplo 1 o preparado recombinantemente a partir de una línea celular de mamífero según el Ejemplo 2), monoclórhidrato de L-histidina monohidratado (disponible en Ajinomoto, Raleigh, NC), L-histidina (disponible en Ajinomoto, Raleigh, NC), ácido etilendiaminotetraacético de disodio dihidratado (disponible como Titriplex III en Merck KgaA, Darmstadt, Alemania),  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada (disponible como número de producto T-104-1-MC de Ferro Pfanstiehl, Waukegan IL) y polisorbato 80 (disponible como Crillet 4 HP de Croda Inc., Mill Hall PA).

- 15 Se preparó la composición farmacéutica líquida preparando en primer lugar varias soluciones madre del anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab, monoclórhidrato de L-histidina monohidratado, ácido etilendiaminotetraacético de disodio dihidratado,  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada y polisorbato 80. Se prepara un tampón de histidina 20 mM a pH 5,5 disolviendo L-histidina-HCl monohidratado 3,27 mg/ml (15,6 mM) y L-histidina 0,68 mg/ml (4,4 mM) en agua. Se prepara un tampón de formulación 1X disolviendo HCl de L-histidina monohidratado 3,27 mg/ml (15,6 mM) y L-histidina 0,68 mg/ml (4,4 mM),  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada 84 mg/ml (222 mM), polisorbato 80 0,2 mg/ml y ácido etilendiaminotetraacético de disodio dihidratado 0,1 mg/ml (0,268 mM) en agua. Se prepara un tampón de formulación 2X disolviendo HCl de L-histidina monohidratado 3,27 mg/ml (15,6 mM) y L-histidina 0,68 mg/ml (4,4 mM),  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada 168 mg/ml (444 mM), polisorbato 80 0,4 mg/ml y ácido etilendiaminotetraacético de disodio dihidratado 0,2 mg/ml (0,536 mM) en agua. Se prepara una solución madre del anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab según el Ejemplo 2 y se concentra a entre 42 y 55 mg/ml (objetivo 45 mg/ml) en el tampón de histidina usando un proceso de ultrafiltración llevado a cabo con una membrana de tipo 50 kDa (Biomax PES).

- 25 Para preparar la composición farmacéutica, se añaden volúmenes iguales de la solución madre concentrada del anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab y el tampón de formulación 2X a un envase adecuado para mezclado íntimo de composiciones líquidas. Después de mezclar, se retira un pequeño volumen de solución y se determina la concentración de anticuerpo mediante el procedimiento de espectrometría de ultravioleta-visible (UV-Vis), usando un coeficiente de extinción de  $1,43 \text{ (mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (intervalo esperado de 21 a 27,5 mg/ml, objetivo 22,5 mg/ml).  
30 Finalmente, se añade un volumen apropiadamente calculado de tampón de formulación 1X y se mezcla, llevando el anticuerpo a la concentración objetivo de 20 mg/ml (intervalo 18-22 mg/ml).

- Se filtran entonces las composiciones farmacéuticas a través de filtros de grado esterilizante de 0,2  $\mu\text{m}$  y se rellenan en viales. Se usó un volumen de relleno nominal de 20 ml en viales de vidrio de tipo 1 de 20 ml. Se cerraron los viales con tapones recubiertos Daikyo 777-1 FluroteC® y se sellaron por engastado. Se esterilizaron los viales de vidrio así como los tapones de suero de 20 mm Daikyo 777-1.

Cada unidad de vial individual contiene aproximadamente 400 mg del anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab, 65,4 mg de monoclórhidrato de L-histidina monohidratado, 13,6 mg de L-histidina, 2 mg de ácido etilendiaminotetraacético de disodio dihidratado, 1680 mg de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada y 4 mg de polisorbato 80.

EJEMPLO 14

- 40 Este ejemplo ilustra la producción potencial de composición farmacéutica líquida que contiene el anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab, monoclórhidrato de L-histidina monohidratada, etilendiaminotetraacetato de calcio y disodio,  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada y polisorbato 80.

- 45 Se formó dicha composición farmacéutica líquida obteniendo los siguientes componentes: el anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab (disponible en la línea celular de hibridoma 11.2.1.4 depositada con el número de acceso a ATCC PTA-5169 según el Ejemplo 1 o se preparó recombinantemente a partir de una línea celular de mamífero según el Ejemplo 2), monoclórhidrato de L-histidina monohidratado (disponible en Ajinomoto, Raleigh, NC), L-histidina (disponible en Ajinomoto, Raleigh, NC), ácido etilendiaminotetraacético de calcio y disodio (disponible en Sigma-Aldrich, St. Louis, MO),  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada (disponible como número de producto T-104-1-MC de Ferro Pfanstiehl, Waukegan IL) y polisorbato 80 (disponible como Crillet 4 HP de Croda Inc., Mill Hall PA).

- 50 Puede prepararse la composición farmacéutica líquida preparando en primer lugar varias soluciones madre del anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab, monoclórhidrato de L-histidina monohidratado, ácido etilendiaminotetraacético de disodio dihidratado,  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada y polisorbato 80. Puede prepararse un tampón de histidina 20 mM a pH 5,5 disolviendo HCl de L-histidina monohidratado 3,27 mg/ml (15,6 mM) y L-histidina 0,68 mg/ml (4,4 mM) en agua. Puede prepararse un tampón de formulación 1X disolviendo HCl de L-histidina monohidratado 3,27 mg/ml (15,6 mM) y L-histidina 0,68 mg/ml (4,4 mM),  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada 84 mg/ml (222 mM), polisorbato 80 0,2 mg/ml y ácido etilendiaminotetraacético de calcio y disodio 0,1003 mg/mL (0,268 mM) en agua. Puede prepararse un tampón de formulación 2X disolviendo HCl de L-histidina monohidratado 3,27 mg/ml (15,6 mM) y L-histidina 0,68

mg/ml (4,4 mM),  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada 168 mg/ml (444 mM), polisorbato 80 0,4 mg/ml y ácido etilendiaminotetraacético de calcio y disodio 0,2006 mg/ml (0,536 mM) en agua. Se prepara una solución madre del anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab según el Ejemplo 2 y se concentra a entre 42 y 55 mg/ml (objetivo 45 mg/ml) en el tampón de histidina usando un proceso de ultrafiltración llevado a cabo con una membrana de tipo 50 kDa (Biomax PES).

Para preparar la composición farmacéutica, pueden añadirse volúmenes iguales de la solución madre concentrada del anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab y el tampón de formulación 2X a un envase adecuado para mezclado íntimo de composiciones líquidas. Después de mezclar, puede retirarse un pequeño volumen de solución y se determina la concentración de anticuerpo mediante el procedimiento de espectrometría de ultravioleta-visible (UV-Vis), usando un coeficiente de extinción de  $1,43 \text{ (mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (intervalo esperado de 21 a 27,5 mg/ml, objetivo 22,5 mg/ml). Finalmente, puede añadirse un volumen apropiadamente calculado de tampón de formulación 1X y se mezcla, llevando el anticuerpo a la concentración objetivo de 20 mg/ml (intervalo 18-22 mg/ml).

Se pueden filtrar entonces las composiciones farmacéuticas a través de filtros de grado esterilizante de 0,2  $\mu\text{m}$  y rellenarse en viales. Puede usarse un volumen de relleno nominal de 20 ml en viales de vidrio de tipo 1 de 20 ml. Pueden cerrarse entonces los viales con tapones recubiertos Daikyo 777-1 FluroteC® y sellarse por engastado. Pueden esterilizarse los viales de vidrio así como los tapones de suero de 20 mm Daikyo 777-1.

Cada unidad de vial individual contendría aproximadamente 400 mg del anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab, 65,4 mg de monoclóhidrato de L-histidina monohidratado, 13,6 mg de L-histidina, 2,006 mg de ácido etilendiaminotetraacético de calcio y disodio, 1680 mg de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada y 4 mg de polisorbato 80.

#### EJEMPLO 15

Este ejemplo ilustra la producción potencial de composición farmacéutica líquida que contiene el anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab, monoclóhidrato de L-histidina monohidratado, ácido etilendiaminotetraacético de trisodio,  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada y polisorbato 80.

Se formó dicha composición farmacéutica líquida obteniendo los siguientes componentes: el anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab (disponible en la línea celular de hibridoma 11.2.1.4 depositada con el número de acceso a ATCC PTA-5169 según el Ejemplo 1 o preparado recombinantemente a partir de una línea celular de mamífero según el Ejemplo 2), monoclóhidrato de L-histidina monohidratado (disponible en Ajinomoto, Raleigh, NC), L-histidina (disponible en Ajinomoto, Raleigh, NC), ácido etilendiaminotetraacético de trisodio (disponible en Sigma-Aldrich, St. Louis, MO),  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratado (disponible como número de producto T-104-1-MC de Ferro Pfanstiehl, Waukegan IL) y polisorbato 80 (disponible como Crillet 4 HP de Croda Inc., Mill Hall PA).

Se preparó la composición farmacéutica líquida preparando en primer lugar varias soluciones madre del anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab, monoclóhidrato de L-histidina monohidratado, ácido etilendiaminotetraacético de trisodio,  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada y polisorbato 80. Se prepara un tampón de histidina 20 mM a pH 5,5 disolviendo HCl de L-histidina monohidratado 3,27 mg/ml (15,6 mM) y L-histidina 0,68 mg/ml (4,4 mM) en agua. Se prepara un tampón de formulación 1X disolviendo HCl de L-histidina monohidratado 3,27 mg/ml (15,6 mM) y L-histidina 0,68 mg/ml (4,4 mM),  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada 84 mg/ml (222 mM), polisorbato 80 0,2 mg/ml y ácido etilendiaminotetraacético de trisodio 0,096 mg/ml (0,268 mM) en agua. Se prepara un tampón de formulación 2X disolviendo HCl de L-histidina monohidratado 3,27 mg/ml (15,6 mM), y L-histidina 0,68 mg/ml (4,4 mM),  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada 168 mg/ml (444 mM), polisorbato 80 0,4 mg/ml y ácido etilendiaminotetraacético de trisodio 0,192 mg/ml (0,536 mM) en agua. Se prepara una solución madre del anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab según el Ejemplo 2 y se concentra a entre 42 y 55 mg/ml (objetivo 45 mg/ml) en el tampón de histidina usando un proceso de ultrafiltración llevado a cabo con una membrana de tipo 50 kDa (Biomax PES).

Para preparar la composición farmacéutica, se añaden volúmenes iguales de la solución madre concentrada del anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab y el tampón de formulación 2X a un envase adecuado para mezclado íntimo de composiciones líquidas. Después de mezclar, se retira un pequeño volumen de solución y se determina la concentración de anticuerpo mediante el procedimiento de espectrometría de ultravioleta-visible (UV-Vis), usando un coeficiente de extinción de  $1,43 \text{ (mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (intervalo esperado de 21 a 27,5 mg/ml, objetivo 22,5 mg/ml). Finalmente, se añade un volumen apropiadamente calculado de tampón de formulación 1X y se mezcla, llevando el anticuerpo a la concentración objetivo de 20 mg/ml (intervalo 18-22 mg/ml).

Se filtran entonces las composiciones farmacéuticas a través de filtros de grado esterilizante de 0,2  $\mu\text{m}$  y se rellenan en viales. Se usó un volumen de relleno nominal de 20 ml en viales de vidrio de tipo 1 de 20 ml. Se cerraron los viales con tapones recubiertos Daikyo 777-1 FluroteC® y se sellaron por engastado. Se esterilizaron los viales de vidrio así como los tapones de suero de 20 mm Daikyo 777-1.

Cada unidad de vial individual contiene aproximadamente 400 mg del anticuerpo anti-CTLA-4 ticilimumab, 65,4 mg de monoclóhidrato de L-histidina monohidratado, 13,6 mg de L-histidina, 1,92 mg de ácido etilendiaminotetraacético de trisodio, 1680 mg de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa dihidratada y 4 mg de polisorbato 80.

**Secuencias**

ADN de cadena pesada de ticilimumab (11.2.1) (SEQ ID NO: 1)

atggagtttg	ggctgagctg	ggttttccctc	gttgcctcttt	taagaggtgt	ccagtgctcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagcgt	ctggattcac	cttcagtagc	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcagttata	tggtatgatg	gaagtaataa	atactatgca	240
gactccgtga	agggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcctgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	agatccgagg	360
ggagctacc	tttactacta	ctactacggg	atggacgtct	ggggccaagg	gaccacggtc	420
accgtctcct	cagcctccac	caagggccca	tcggtcttcc	ccctggcgcc	ctgctccagg	480
agcacctccg	agagcacagc	ggccctgggc	tgctgtgca	aggactactt	ccccgaaccg	540
gtgacgggtg	cgtggaactc	aggcgctctg	accagcggcg	tgcacacctt	cccagctgtc	600
ctacagctc	caggactcta	ctccctcagc	agcgtgggtg	ccgtgcctc	cagcaacttc	660
ggcaccaga	cctacacctg	caacgtagat	cacaagccca	gcaaacccaa	ggtggacaag	720
acagttgagc	gcaaatgttg	tgtegagtg	ccaccgtgcc	cagcaccacc	tgtggcagga	780
ccgtcagctc	tctcttccc	cccaaaacc	aaggacaccc	tcatgatctc	ccggaccctt	840
gaggtcacgt	gcgtgggtgg	ggacgtgagc	cacgaagacc	ccgaggtcca	gttcaactgg	900
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cacgggagga	gcagttcaac	960
agcacgttcc	gtgtggtcag	cgctctcacc	gttgtgcacc	aggactgggt	gaacggcaag	1020
gagtacaagt	gcaaggtctc	caacaaaggc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	1080
aaaaccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	gtgtacaccc	tgccccatc	ccgggaggag	1140
atgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctggtcaaag	gcttctacc	cagcgacatc	1200
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	acctcccatg	1260
ctggactccg	acggctcctt	cttctctac	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	1320
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	1380
cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa	tga			1413

Proteína de cadena pesada de ticilimumab (11.2.1) (SEQ ID NO: 2)

<u>[QVQLVESGGG</u>	<u>VVQPRSLRL</u>	<u>SCAASGFTFS</u>	<u>SYGMHWVRQA</u>	<u>PGKLEWVAV</u>	<u>IWYDGSNKYY</u>	60
<u>ADSVKGRFTI</u>	<u>SRDNSKNTLY</u>	<u>LQMSLRAED</u>	<u>TAVYYCARDP</u>	<u>RGATLYYYYY</u>	<u>GMDVWGQGT</u>	120
<u>VTVSS]ASTKG</u>	<u>PSVFLAPCS</u>	<u>RSTSESTAAL</u>	<u>GCLVKDYFPE</u>	<u>PVTVSWNSGA</u>	<u>LTSGVHTFPA</u>	180
<u>VLQSSGLYSL</u>	<u>SSVVTVPSSN</u>	<u>FGTQTYTCNV</u>	<u>DHKPSNTKVD</u>	<u>KTVERKCCVE</u>	<u>CPPCPAPPVA</u>	240
<u>GPSVFLFPPK</u>	<u>PKDTLMISRT</u>	<u>PEVTCVVVDV</u>	<u>SHEDPEVQFN</u>	<u>WYVDGVEVHN</u>	<u>AKTKPREEQF</u>	300
<u>NSTFRVSVL</u>	<u>TVVHQDWLNG</u>	<u>KEYKCKVSNK</u>	<u>GLPAPIEKTI</u>	<u>SKTKGQPREP</u>	<u>QVYTLPPSRE</u>	360
<u>EMTKNQVSLT</u>	<u>CLVKGFYPSD</u>	<u>IAVEWESNGQ</u>	<u>PENNYKTPPP</u>	<u>MLDSDSGFFL</u>	<u>YSKLTVDKSR</u>	420
<u>WQQGNVFS</u>	<u>VMHEALHNHY</u>	<u>TQKLSLSLSPG</u>	<u>K</u>			451

5

Se representa la región variable (SEQ ID NO: 5) [entre corchetes] y se subrayan las CDR. La CDR1 está indicada por la SEQ ID NO: 7, la CDR2 por la SEQ ID NO: 8 y la CDR3 por la SEQ ID NO: 9.

ADN de cadena ligera de ticilimumab (11.2.1) (SEQ ID NO: 3)

atggacatga	gggtccccgc	tcagctcctg	gggctcctgc	tactctggct	ccgaggtgcc	60
agatgtgaca	tccagatgac	ccagctctcca	tctcctctgt	ctgcatctgt	aggagacaga	120
gtcaccatca	cttgccgggc	aagtcagagc	attaacagct	atttagattg	gtatcagcag	180
aaaccagggg	aagcccctaa	actcctgac	tatgctgcat	ccagtttgca	aagtggggtc	240
ccatcaaggt	tcagtggcag	tggatctggg	acagatttca	ctctcaccat	cagcagctctg	300
caacctgaag	atthtgcaac	ttactactgt	caacagtatt	acagtactcc	attcactttc	360
ggcctgggga	ccaaagtgga	aatcaaacga	actgtgctctg	caccatctgt	cttcatcttc	420
ccgcatctg	atgagcagtt	gaaatctgga	actgcctctg	ttgtgtgctt	gctgaataac	480
ttctatccca	gagaggccaa	agtacagtg	aaggtggata	acgccctcca	atcgggtaac	540
tcccaggaga	gtgtcacaga	gcaggacagc	aaggacagca	cctacagcct	cagcagcacc	600
ctgacgctga	gcaaagcaga	ctacgagaaa	cacaaagtct	acgcctgcga	agtcacccat	660
cagggcctga	gctcgcccgt	cacaaagagc	ttcaacaggg	gagagtgtta	gtga	714

10 Proteína de cadena ligera de ticilimumab (11.2.1) (SEQ ID NO: 4)

# ES 2 707 284 T3

```
【DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASOSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIK】RTV AAPSVFIFPP 120
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT 180
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
```

Se representa la región variable (SEQ ID NO: 6) [entre corchetes] y se subrayan las CDR. La CDR1 está indicada por la SEQ ID NO: 10, la CDR2 por la SEQ ID NO: 11y la CDR3 por la SEQ ID NO: 12.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica líquida que comprende:  
un agente quelante, en la que el agente quelante es EDTA, una sal de EDTA, DTPA, o una sal de DTPA a una concentración de 0,01 mM a 5,0 mM;
- 5 histidina a una concentración de 1 mM a 100 mM; y  
un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano que se une a CTLA-4 humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, anticuerpo o porción de unión a antígeno que está a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 7, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 8, y una CDR3 de cadena pesada que  
10 comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 9 y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 10, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 11, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 12.
2. La composición según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo es un anticuerpo de IgG2 humano.
3. La composición según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo comprende la secuencia aminoacídica de dominio variable de cadena pesada en la SEQ ID NO: 2 y la secuencia aminoacídica de dominio variable de cadena ligera en la SEQ ID NO: 4.
- 15 4. La composición según la reivindicación 3, en la que el anticuerpo comprende la secuencia aminoacídica de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y la secuencia aminoacídica de cadena ligera de SEQ ID NO: 4.
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el agente quelante es DTPA.
- 20 6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el agente quelante es EDTA.
7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la composición comprende adicionalmente un agente de tonicidad.
8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la composición comprende adicionalmente un tensioactivo.
- 25 9. La composición según la reivindicación 8, en la que el tensioactivo es un polisorbato.
10. La composición según la reivindicación 9, en la que el polisorbato es polisorbato 80.
11. La composición según la reivindicación 7, en la que el agente de tonicidad es un poliol.
12. La composición según la reivindicación 11, en la que el poliol es trehalosa.
13. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la composición comprende un  
30 antioxidante.
14. La composición según la reivindicación 13, en la que el antioxidante es metionina a una concentración de desde 1 mM hasta 100 mM.
15. La composición según la reivindicación 8, en la que la composición comprende:  
el anticuerpo a una concentración de 0,1 mg/ml a 100 mg/ml;
- 35 EDTA a una concentración de 0,01 mM a 1,0 mM;  
histidina a una concentración de 1 mM a 100 mM;  
polisorbato 80 a una concentración de 0,01 mg/ml a 10 mg/ml y  
el agente de tonicidad a una concentración de 100 mM a 300 mM.
16. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que después de almacenamiento durante un periodo de 24 semanas a una temperatura de 40 °C, un área de pico de cromatograma agregado para la composición es al menos un 2 % menor que un área de pico de cromatograma agregado para una composición por lo demás idéntica que carece del agente quelante y que se almacena en condiciones idénticas.
- 40 17. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 para uso en el tratamiento de una afección neoplásica en un sujeto.

18. La composición según la reivindicación 17, en la que la afección neoplásica es melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de hígado, mesotelioma, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático o cáncer de mama.

19. La composición según la reivindicación 17 ó 18, en la que el sujeto es un ser humano.

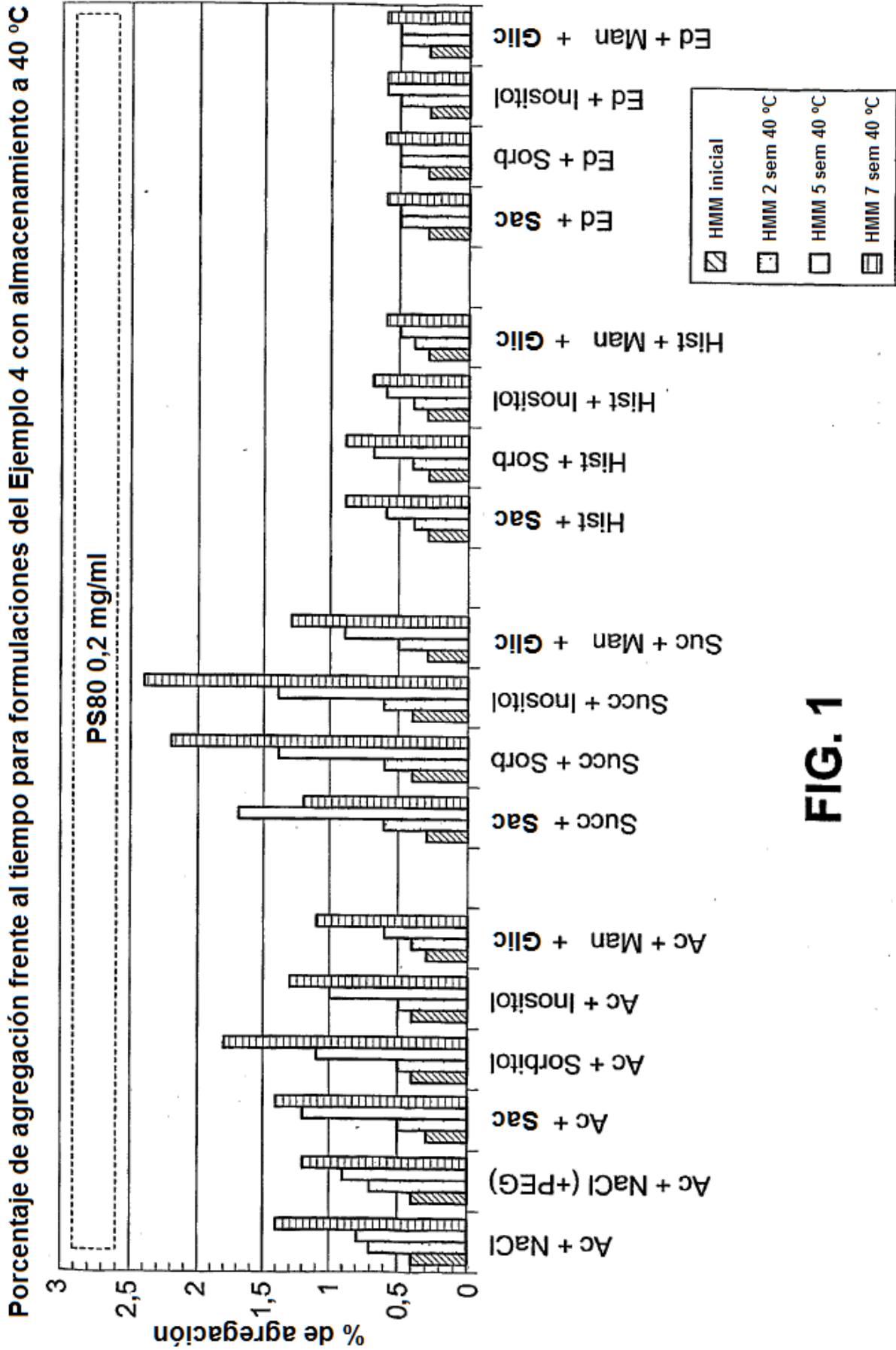


FIG. 1

Porcentaje de fragmentación (impurezas de hidrólisis) frente al tiempo para formulaciones del Ejemplo 4 con almacenamiento a 40 °C

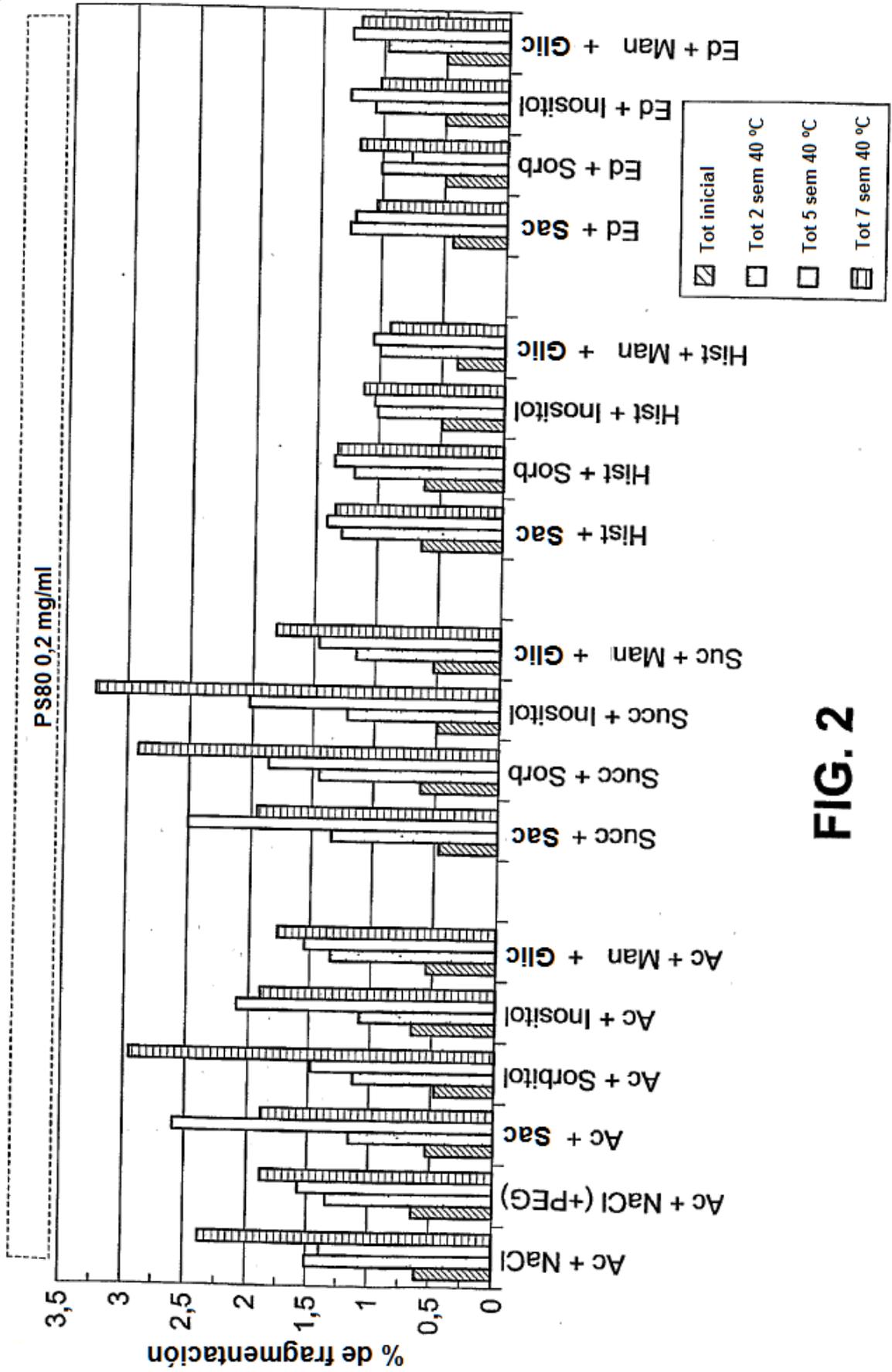
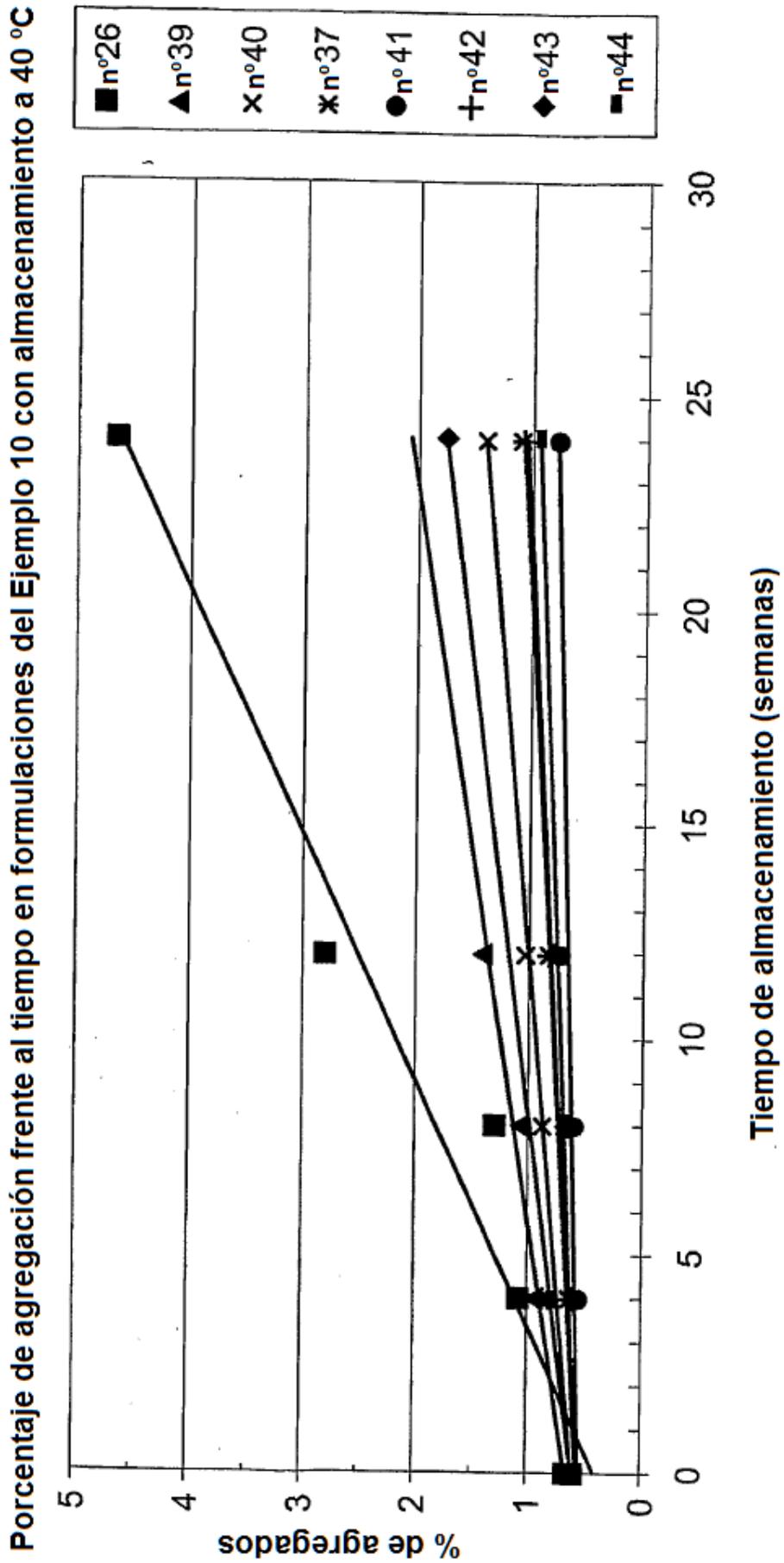
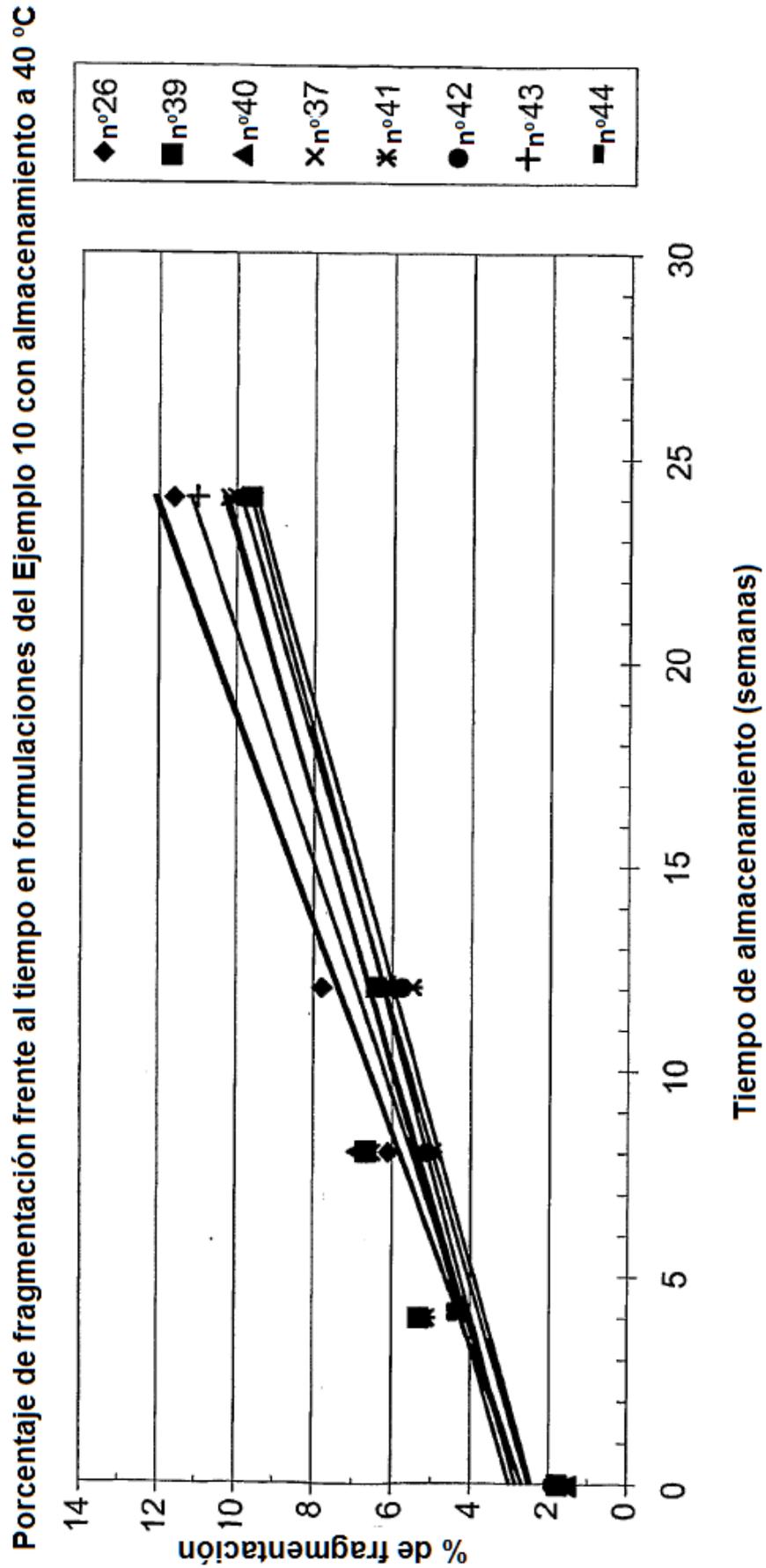


FIG. 2

**FIG. 3**

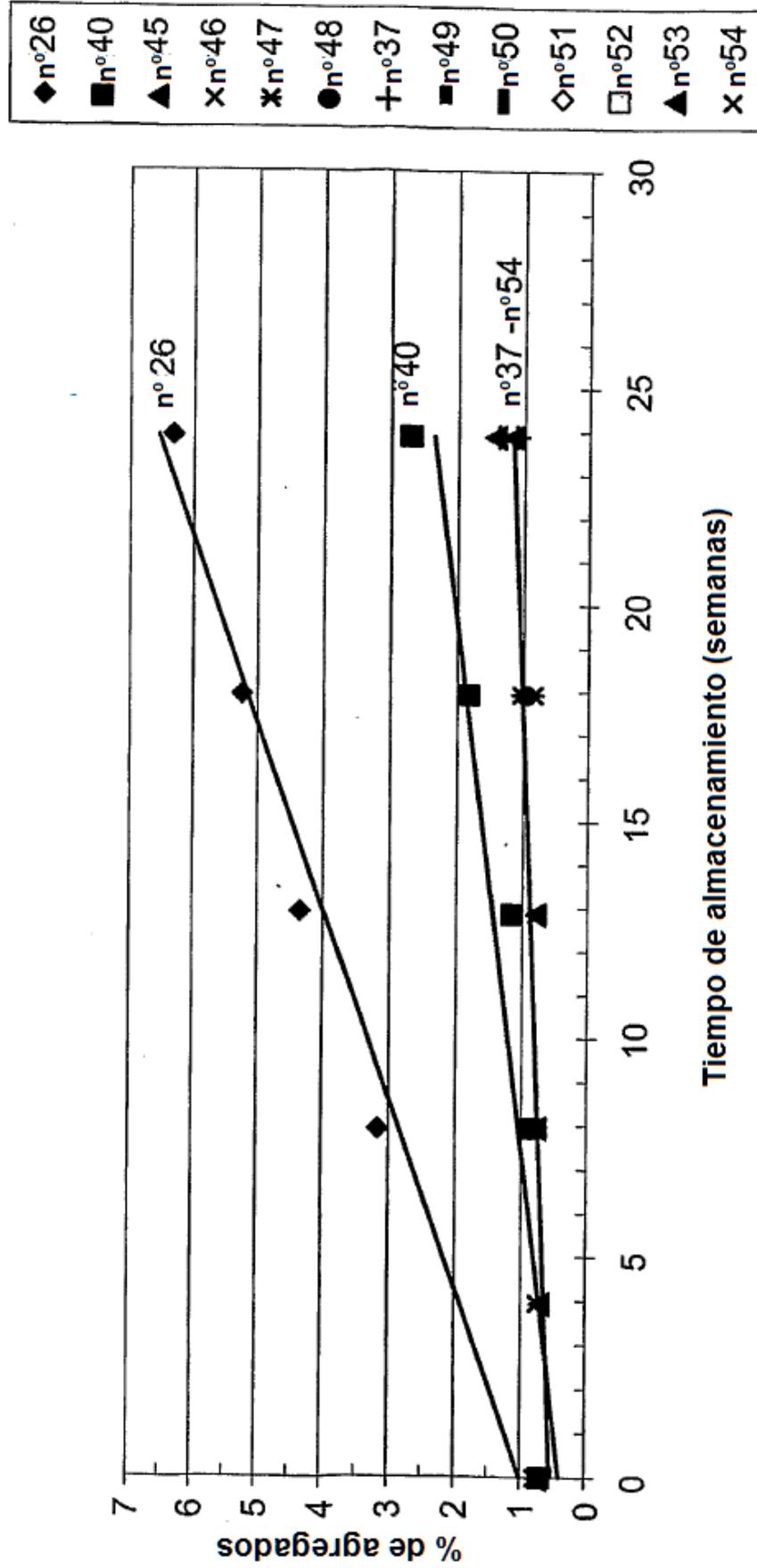


**FIG. 4**



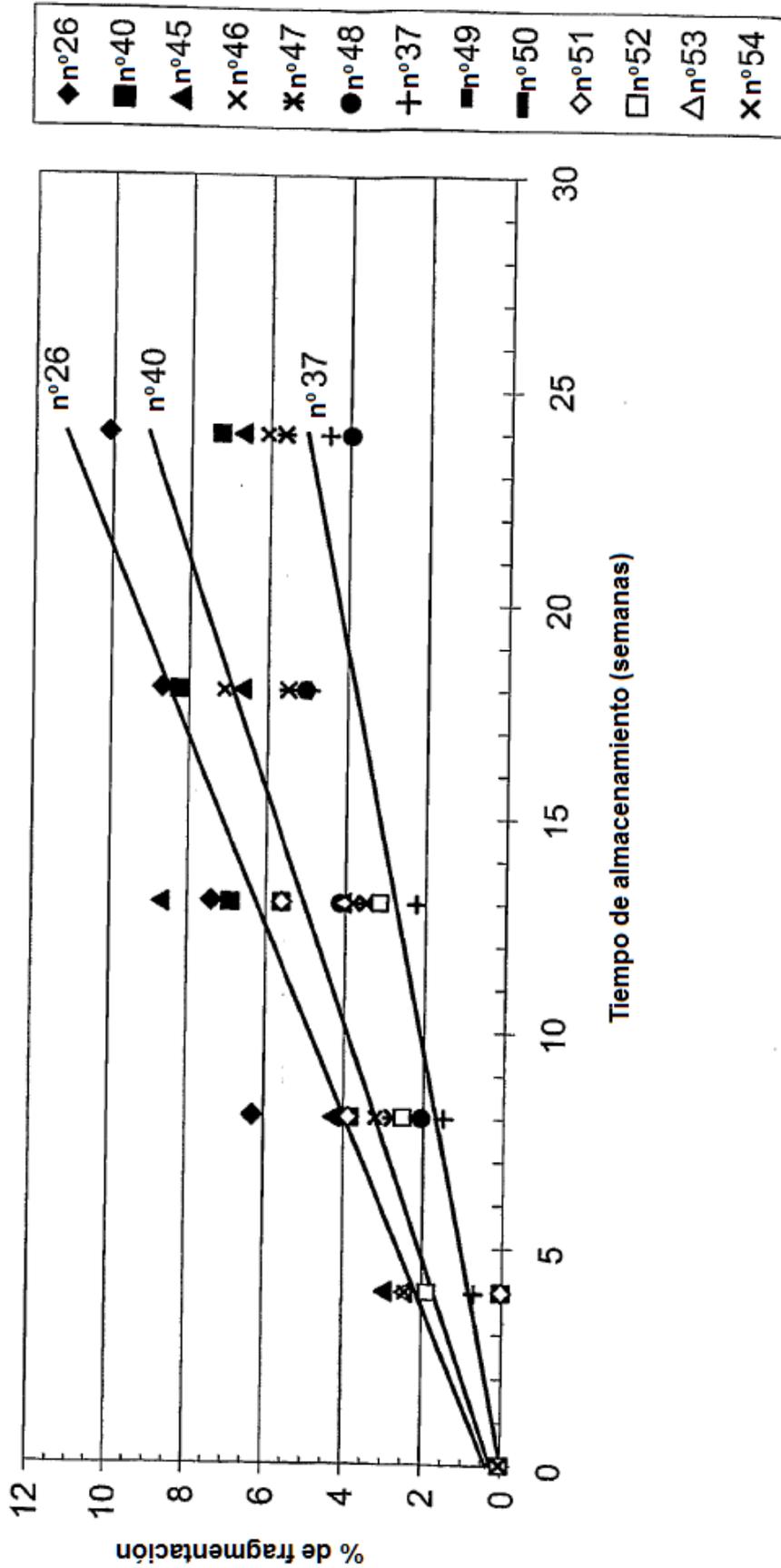
**FIG. 5**

Porcentaje de agregación frente al tiempo en formulaciones del Ejemplo 11 con almacenamiento a 40 °C



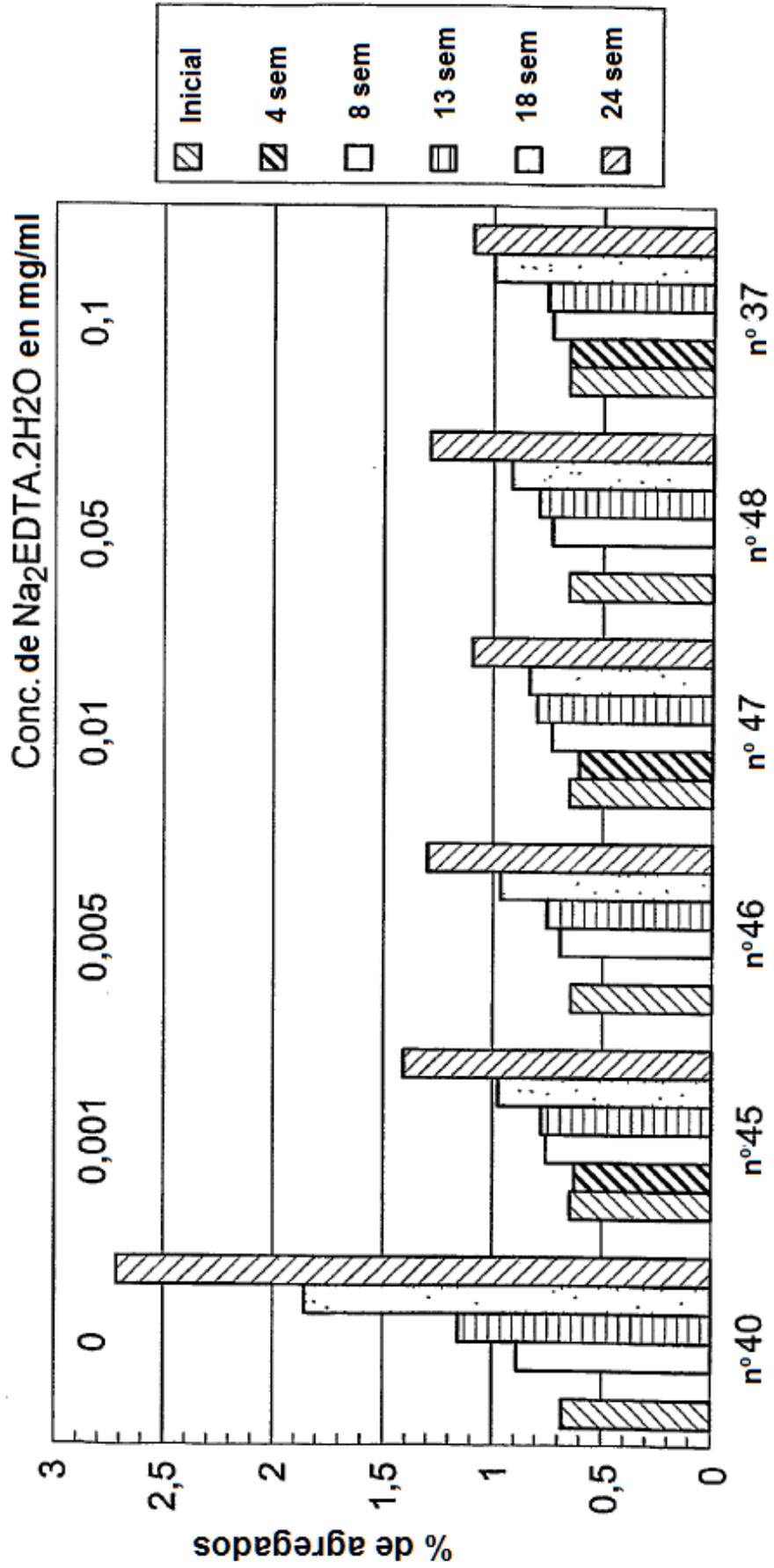
**FIG. 6**

Porcentaje de fragmentación (impurezas de hidrólisis) frente al tiempo en formulaciones del Ejemplo 11 con almacenamiento a 40 °C



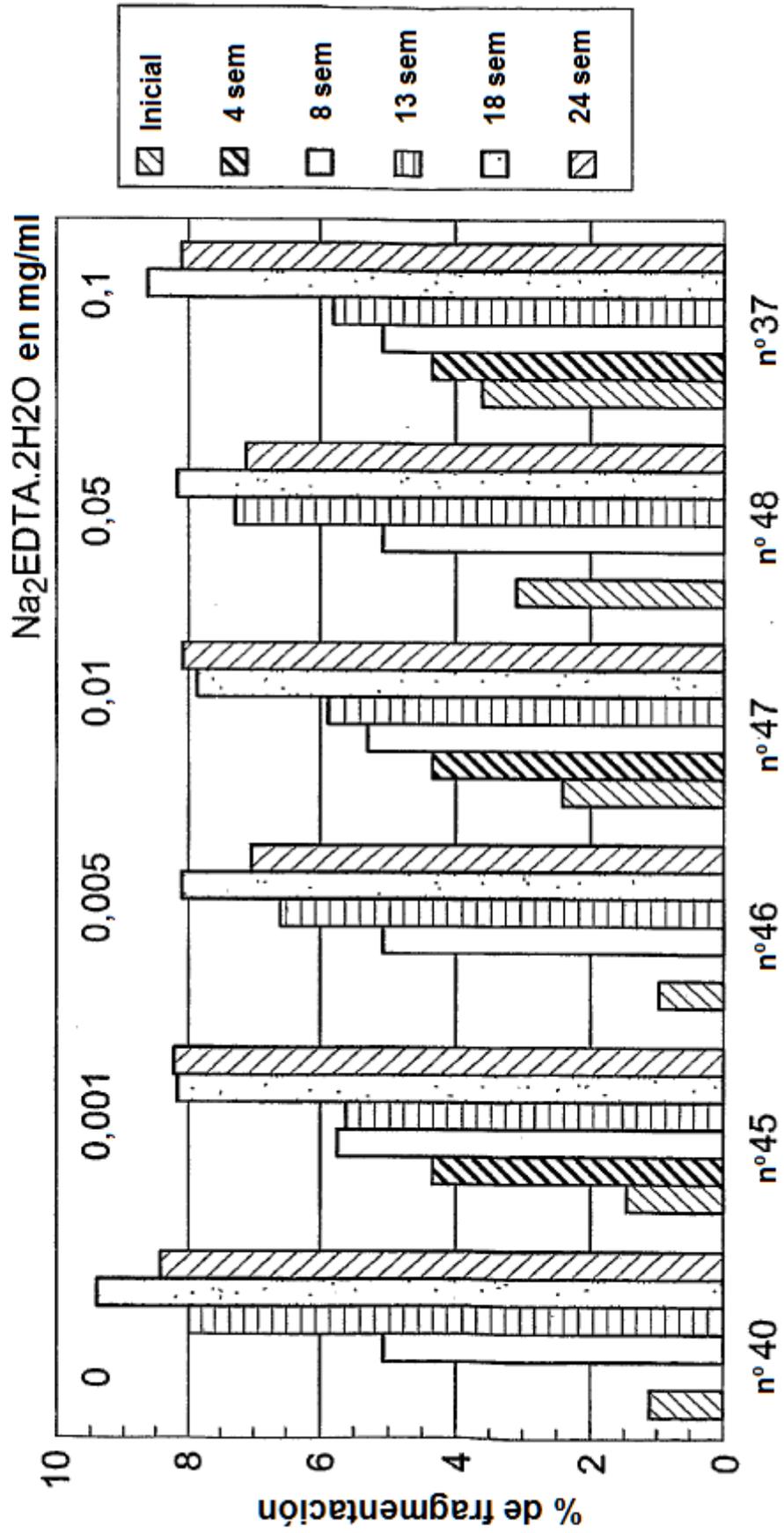
# FIG. 7

Impacto de la concentración de EDTA sobre el porcentaje de agregación para formulaciones del Ejemplo 11 con almacenamiento a 40 °C



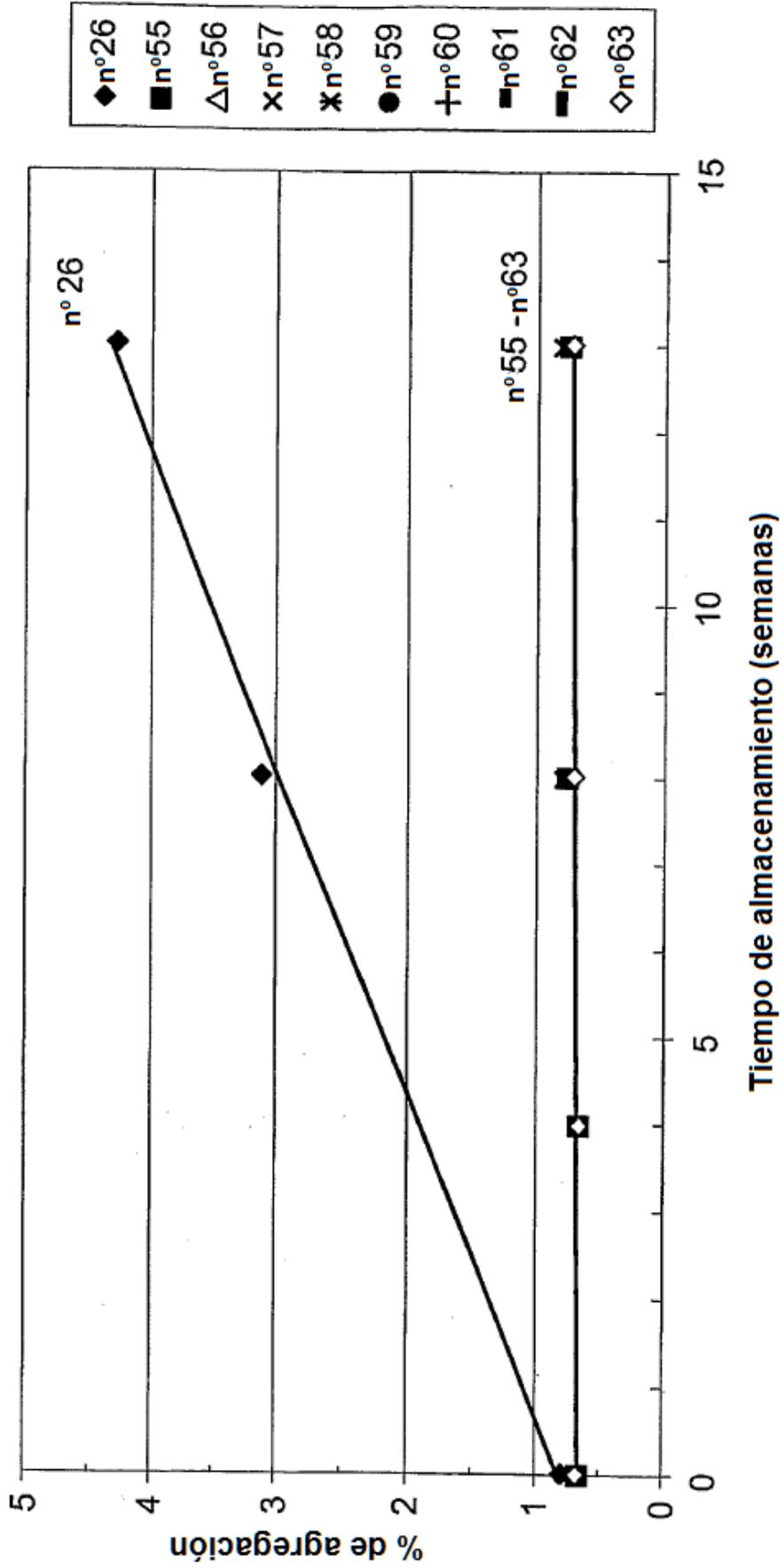
**FIG. 8**

Impacto de la concentración de EDTA sobre el porcentaje de fragmentación para formulaciones del Ejemplo 11 con almacenamiento a 40 °C



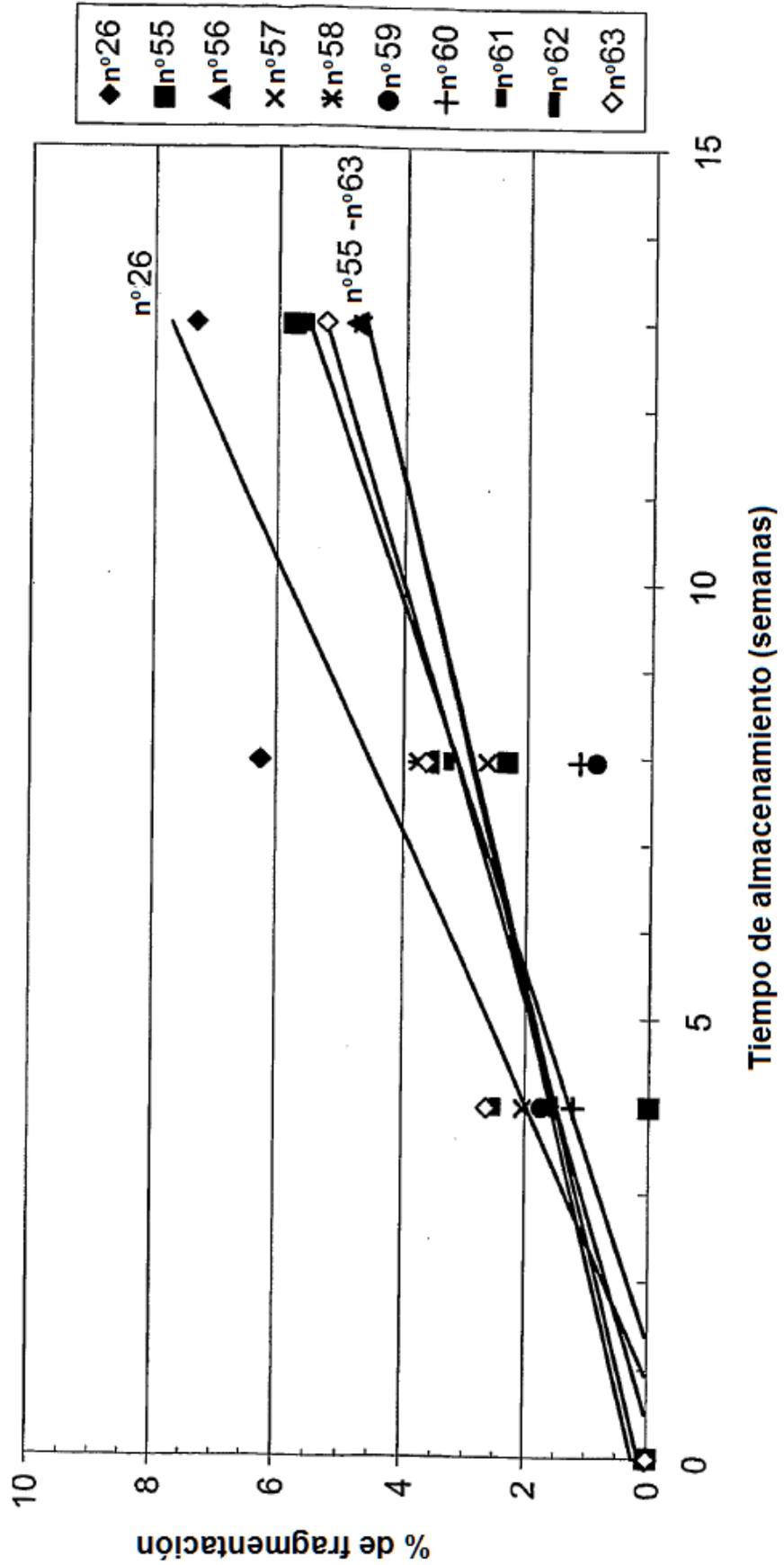
**FIG. 9**

Porcentaje de agregación frente al tiempo en formulaciones del Ejemplo 12 con almacenamiento a 40 °C



**FIG. 10**

Porcentaje de fragmentación (impurezas de hidrólisis) frente al tiempo en formulaciones del Ejemplo 12 con almacenamiento a 40 °C



**FIG. 11A**

ADN de cadena pesada de ticilimumab (11.2.1) (SEQ ID NO: 1)

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc 120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggatgatg gaagtaataa atactatgca 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatccgagg 360
ggagctaccc ttactacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 420
accgtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc cctggcgcc ctgctccagg 480
agcacctccg agagcacagc ggccctgggc tgcttggca aggactactt cccgaaccg 540
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgctctg accagcggcg tgcacacctt cccagctgtc 600
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcaacttc 660
ggcaccaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 720
acagttgagc gcaaatgttg tgtcgagtgc ccaccgtgcc cagcaccacc tgtggcagga 780
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacce aaggacacce tcatgatctc ccggaccct 840
gaggtcacgt gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ccgaggtcca gttcaactgg 900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cacgggagga gcagttcaac 960
agcacgttcc gtgtggtcag cgtcctcacc gttgtgcacc aggactggct gaacggcaag 1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaaggc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080
aaaaccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1140
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctacce cagcgacatc 1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac acctcccatg 1260
ctggactccg acggtcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380
cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaa tga 1413

```

**FIG. 11B**

Proteína de cadena pesada de ticilimumab (11.2.1). (SEQ ID NO: 2)

```

[QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY 60
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGT 120
VTVSS]ASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA 180
VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVRKCCVE CPPCPAPPVA 240
GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF 300
NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE 360
EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP MLDSGGSFFL YSKLTVDKSR 420
WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451

```

Se representa la región variable (SEQ ID NO: 5) [entre corchetes] y se subrayan las CDR. La CDR1 está indicada por la SEQ ID NO: 7, la CDR2 por la SEQ ID NO: 8 y la CDR3 por la SEQ ID NO: 9.

## FIG. 11C

ADN de cadena ligera de ticilimumab (11.2.1) (SEQ ID NO: 3)

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc	60
agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga	120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagagc attaacagct atttagattg gtatcagcag	180
aaaccagggg aagcccctaa actcctgata tatgctgcat ccagtttgca aagtggggtc	240
ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagtctg	300
caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagtatt acagtactcc attcactttc	360
ggccctggga ccaaagtga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc	420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac	480
ttctatcca gagaggcca agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac	540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc	600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat	660
cagggcctga gctcgccctg cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta gtga	714

## FIG. 11D

Proteína de cadena ligera de ticilimumab (11.2.1) SEQ ID NO: 4

[DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASOSIN SYLDWYQOKP GKAPKLLIYA <u>ASSLQSGVPS</u>	60
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ <u>YYSTPFTFGP</u> GTKVEIK]RTV AAPSVFIFPP	120
SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT	180
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK	214

Se representa la región variable (SEQ ID NO: 6) [entre corchetes] y se subrayan las CDR. La CDR1 está indicada por la SEQ ID NO: 10, la CDR2 por la SEQ ID NO: 11 y la CDR3 por la SEQ ID NO: 12.